АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XX. ВЫП. 1

ЯНВАРЬ—ФЕВРАЛЬ

1 ОКТ. 1951

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1951

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор чл.-корр. АН СССР. А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ «МИКРОБИОЛОГИЯ» ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА «АКАДЕМКНИГА».

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XX

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1951

О БАКТЕРИОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМАХ

(К ЭВОЛЮЦИИ ХИЩНИЧЕСТВА И ПАРАЗИТИЗМА)

А. А. Имшенецкий и *Л. А. Кузюрина*

С каждым годом становится все более и более очевидным, что одной из наиболее ярких особенностей микроорганизмов следует считать их способность самым различным образом питаться и получать энергию. Довольно однообразные по своей морфологии микробы обладают исключительно активными ферментными комплексами, дающими им возможность осуществлять такие сложные процессы, как фиксация азота и разложение углеводородов, восстановление сульфатов и спиртовое брожение, а также многое другое. По мере накопления наших сведений в области физиологии и биохимии микробов становится очевидным, что представление о микробах как об организмах, возникших в результате регресса более сложных форм, лишено основания. От примитивного к сложному, от простых процессов к более сложным — таков основной путь эволюции. В связи с этим несомненный интерес представляют и различные типы питания микроорганизмов, так как изучение их позволит осветить эволюцию функции в мире микробов. В этой области сравнительно-физиологических исследований очень мало.

В данной статье изложены результаты исследований, посвященных способности миксобактерий вызывать лизис других бактерий. Уже давно было известно, что присутствие клеток других бактерий оказывает благоприятное влияние на развитие миксобактерий (Pinoy [5]), рост целлюлозных миксобактерий также ускорялся в присутствии посторонних бактерий (Имшенецкий и Солнцева [2]). Однако впервые на способность миксобактерий осуществлять лизис бактериальных клеток указала Солнцева [3], изучавшая лизис фитопатогенных бактерий, вызываемый миксобактериями Myxococcus rubescens и Myxococcus virescens. Ею было доказано, что эти виды вызывают лизис культур ряда фитопатогенных бактерий, и проведены некоторые опыты, выясняющие механизм действия миксобактерий.

В дальнейшем появились аналогичные исследования иностранных ученых, подтверждающие способность различных миксобактерий лизировать клетки других бактерий [4, 6].

Эксперименты, описание которых приведено ниже, имели своей целью выяснить биологическое значение этого явления. При анализе полученных данных была сделана попытка придерживаться эволюционного принципа и осветить наблюдаемые факты, исходя из постепенного усложнения функциональных особенностей микроорганизмов.

Экспериментальная часть

Лизис бактериальных клеток

Исследования были проведены с культурой миксобактерии Myxococcus virescens, изолированной из почвы. Этот микроорганизм хорошо развивался на картофельном агаре, образуя вначале характерный для миксобактерий тонкий налет на поверхности среды. В дальнейшем

в культуре появлялись типичные плодовые тела в виде небольших комочков, располагавшихся концентрическими кругами. Снимать такой налет с поверхности картофельного агара было трудно, поэтому для получения значительного количества клеток миксококка применялось его выращивание при 28° на жидкой картофельной среде. Ее состав был следующий: картофельной крошки 20 г, мела 0,2 г, водопроводной воды 100 мл. Через 7—9 дней после посева миксококка на эту среду на поверхности жидкости появлялась тонкая слизистая пленка розовато-серого цвета. С помощью иглы с загнутым концом, впаянной в длинную стеклянную палочку, пленка извлекалась из колб или пробирок с жидкой картофельной среды и переносилась в стерильную чашку Петри. В ней пленки разрывались на отдельные кусочки, которые и служили в дальнейшем в качестве посевного материала. Опыты были начаты с выяснения способности миксококка лизировать клетки других бактерий. В последнее время большое значение в аналогичных исследованиях придается способности изучаемых бактерий окрашиваться по Граму. Принято всегда выяснять действие того или иного вещества на грамположительных и грамотрицательных бактерий. В связи с этим были взяты B. coli как представитель грамнегативных форм и Staphylococcus aureus как вид, окрашивающийся по Граму. Опыты были проведены в различных модификациях. Первая из них заключалась в том, что на поверхность картофельного агара, налитого в чашки Петри, засевалась кишечная палочка или стрефилококк. Через сутки при 37° на поверхности среды вырастал налет B. coli или Staphylococcus aureus. На этот «живой газон» в нескольких точках наносились кусочки пленки миксококка, и чашки помещались в термостат при 25°. Через двое суток вокруг кусочков пленки миксококка был виден рост последнего, а также образование зон полного растворения клеток бактерий, посеянных предварительно, т. е. стафилококка или кишечной палочки. Диаметр зон на газоне B. coli достигал 18—21 мм.

Второй вариант опытов заключался в том, что посев миксококка и испытуемых бактерий производился одновременно. Вначале с помощью шпателя засевались кишечная палочка или стафилококк. И сразу же на произведенный посев в четырех участках помещались небольшие слизистые комочки, представлявшие собой кусочки пленки миксококка. В этом случае через два дня также появились зоны лизиса. Внешний вид чашек был весьма характерен. Поверхность агара была покрыта обильным налетом, состоявшим из клеток B. coli. Вокруг кусочков пленки миксококка, размер которых варьировал от 3 до 5 мм, имелась широкая (17,5—22,5 мм) зона роста миксококка. Это был тонкий нежный налет, и резко бросалось в глаза полное отсутствие клеток B. coli в зоне роста миксококка, как это видно на рис. 1. Наконец, третья модификация состояла в том, что в чашки Петри на поверхность среды вначале помещались кусочки пленки миксококка, а затем после 24-часового пребывания чашек в термостате на поверхность агаровой среды производился посев тест-микробов таким образом, что посевной материал распределялся вокруг комочков, состоящих из клеток миксококка. В этом случае также появлялись зоны лизиса клеток кишечной палочки или стафилококка. Эти опыты позволяют сделать следующие выводы.

Клетки миксококка, размножаясь, лизируют клетки других бактерий. Лизису подвергаются как грампозитивные виды (St. aureus), так и виды, не окрашивающиеся по Граму (B. coli). Растворение клеток наблюдается независимо от того, развивается ли миксококк вначале, одновременно или позднее. Клетки тест-микробов, размножаясь, не могут заглушить рост миксококка. Последний закономерно разовьется и вызовет растворение клеток других бактерий.

Следует добавить, что лизису несколько легче и скорее подвергались клетки кишечной палочки, чем стафилококка. Обращало на себя внима-

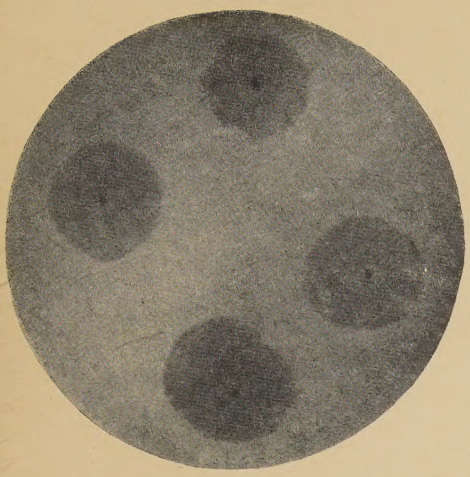


Рис. 1. Зоны лизиса клеток в местах роста миксококка на «живом газоне» B. coli. Посев на картофельный агар одновременно по всей поверхности среды и миксококка четырьмя кусочками пленки (48 часов)

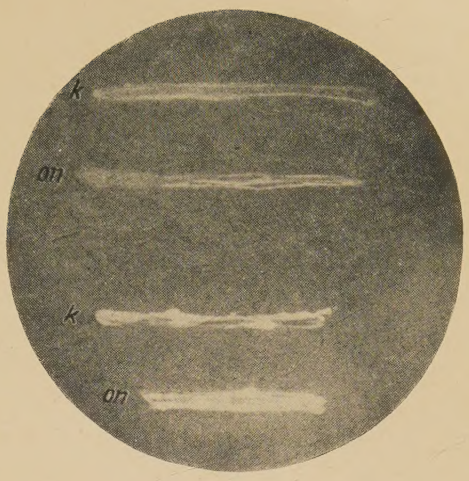


Рис. 2. Растворение клетками миксококка штрихов, состоящих из живых клеток Micrococcus ochraceus и Micr. sulfureus. Рост миксококка на концах двух штрихов, два других штриха не заражены миксококком (контроль). Штрихи сделаны на «голодном агаре» (агар-агар и вода) (48 часов)

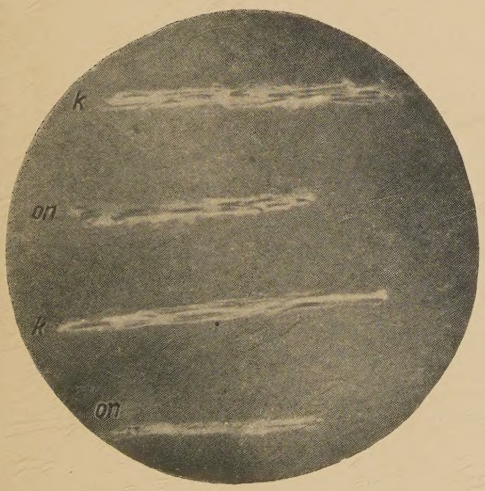


Рис. 3. Питание клеток миксококка клетками Bacterum coli и Staphylococcus aureus. На концах двух штрихов видны зоны растворения. Контрольные штрихи дают представление о первоначальной длине опытных штрихов (48 часов)

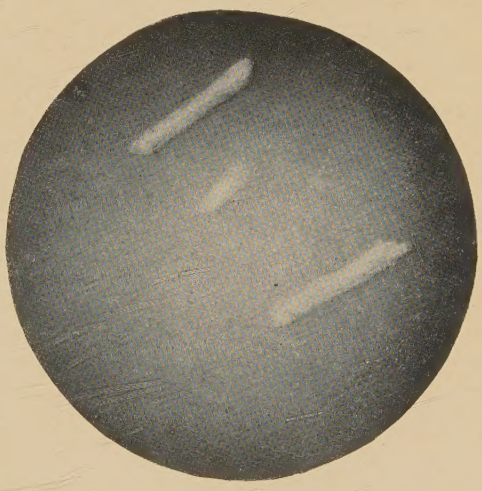


Рис. 4. Клетки миксококка используют в качестве единственного источника питания предпочтительно живые клетки B. coli. Два штриха, сделанные из живых клеток, почти полностью растворены, два других штриха, состоящие из мертвых клеток B. coli, почти не лизированы. Штрихи на «голодном агаре» (агар-агар и вода). Снято через 96 часов после посева миксококка

ние еще одно обстоятельство. Растворение клеток бактерий было настолько закономерным, что за все время исследований не наблюдалось ни разу отсутствие лизиса или даже его ослабление. Многочисленные опыты давали всегда одни и те же результаты. Явления лизиса лучше всего наблюдается на плотной среде с влажной поверхностью — при значительном подсыхании поверхности агаровой среды лизис задерживается.

Питание бактериальными клетками

Выше были описаны опыты, доказывающие способность миксококка лизировать клетки других бактерий, размножающихся на поверхности плотной питательной среды. Обращало на себя внимание, что лизис клеток происходит на картофельной среде, которая по своему составу является прекрасной питательной средой для миксококка. Чем объяснить, что, несмотря на избыток питательных веществ, содержащихся в субстрате, миксококк настойчиво лизирует клетки других бактерий, не довольствуясь источниками пищи, которые он имеет? Не связано ли появление зон лизиса, т. е. исчезновение значительного числа клеток тест-бактерий, с использованием их в качестве источника питания?

Для решения этих вопросов были произведены следующие опыты. В чашки Петри был налит «голодный агар». Он состоял из 2% агар-агара и водопроводной воды. Как показала соответствующая проверка, этот субстрат для миксококка был действительно голодным, так как он на нем не развивался. Затем из музея живых культур было взято 14 видов бактерий и все они посеяны в чашки Петри с мясо-пептонным агаром. Исключение составил Azotobacter chroococcum, посеянный на среду Эшби. Через сутки с поверхности плотной среды был собран урожай бактерий. В опытах со спороносными видами урожай пришлось снимать раньше до начала образования спор в культуре. Собранные клетки помещались в виде толстых и довольно высоких штрихов на поверхность «голодного агара». Из клеток каждого вида делалось два штриха: опытный и контрольный. Ширина, длина и высота всех штрихов были по возможности одинаковыми. На только что приготовленные штрихи наносился кусочек пленки миксококка. Последний наносился только на один из двух штрихов, принадлежавших одному и тому же виду бактерий. Второй штрих оставался не зараженным миксококком. Кусочек пленки миксококка помещался вблизи одного из концов штриха. Затем чашки Петри помещались в термостат при 26°. В течение ближайших 8—10 дней велись наблюдения за развитием миксококка. Слизистый комочек являлся точкой, откуда начинался рост миксококка. Через два-три дня от начала опыта вокруг кусочка пленки появлялась небольшая зона лизиса, затем клетки миксококка начинали двигаться по штриху, захватывая все новые и новые участки штриха и одновременно полностью уничтожая клетки испытуемых бактерий. Происходило как бы поедание штриха с одного из концов. Сравнивая длину лизирующегося и контрольного штрихов, всегда можно было составить представление о скорости и характере лизиса. Представление о начальных стадиях растворения штриха дают рис. 2 и 3, на которых изображены как опытные, так и контрольные штрихи: Micrococcus sulfureus, Micrococcus carneus, Staphylococcus aureus, Bacterium coli. Еще через один-два дня клетки миксококка распространятся по всему штриху и полностью его уничтожат, а на «голодном агаре» будет виден только рост миксобактерий. Очертания этого роста будут соответствовать контурам штриха (рис. 4). За эти пределы рост миксококка не распространяется, так как среда не пригодна для его развития.

При проверке способности миксококка лизировать различные культуры были получены следующие данные.

Растворение штрихов, сделанных из живых клеток	Нет растворения штрихов
1. Micrococcus sulfureus	1. Bact. prodigiosum (пигментная форма)
2. „ carneus	2. Bac. mesentericus fuscus
3. Staphylococcus aureus	3. Неспороносная бактерия, образующая слизь (точнее не идентифицирована)
4. Sarcina aurantiaca	4. Azotobacter chroococcum
5. „ aurescens	
6. „ lutea	
7. Bact. prodigiosum (лейкораса)	
8. Bact. pyocyaneum	
9. Bact. fluorescens liquefaciens	
10. Bact. coli	

Мы видим, что клетки 10 видов бактерий из испытанных 14 растворялись миксококком. Так как полное исчезновение штрихов происходило на голодном агаре, на котором миксококк абсолютно не развивается, то можно было заключить, что миксококк использует в качестве единственного источника питания клетки других микробов. В качестве пищи для данного вида миксобактерии могут служить разнообразные грамположительные и грамотрицательные микробы. Миксококк очень неприхотлив и с полным основанием должен быть назван бактериотрофным организмом. Для него остаются недоступными виды, имеющие соответствующую «броню». К ним относится Azotobacter chroococcum, слизистая капсула которого, повидимому, является серьезным препятствием для проникновения веществ, помогающих миксококку овладеть своей пищей. В одинаковой мере это относится и к другому виду бактерии, также образующей слизистую капсулу. Несомненный интерес представляет тот факт, что лейкораса Bact. prodigiosum, не образующая пигмента продигиозина, может быть источником пищи для миксококка, тогда как исходная красная форма для него недоступна. Очевидно, образуемый ею токсичный продигиозин угнетает миксококка. Здесь полностью подтверждаются данные одного из авторов, наблюдавшего, что клетки белой расы Bact. prodigiosum захватываются амебами и инфузориями и перевариваются, тогда как исходная красная раса этого же вида бактерии действует резко антагонистически и убивает простейших (Имшенецкий [1]).

Таким образом, живые клетки микробов, несомненно молодые, так как они были взяты из культуры 24-часового возраста, могут служить пищей для миксококка. Естественно возникал вопрос, способны ли протеолитические и другие ферменты воздействовать непосредственно на живую клетку, или микробы, служащие пищей, должны быть вначале убиты продуктами жизнедеятельности миксококка и только затем «переварены» комплексом экзоферментов. Казалось, что мертвые бактериальные клетки должны быть гораздо лучшим источником пищи, чем живые. Для выяснения этого вопроса были сделаны штрихи на поверхности «голодного агара» из живых клеток B. coli и клеток этой же бактерии, но убитых кратковременным кипячением. В одной и той же чашке Петри было сделано четыре штриха: два из мертвых клеток и два из живых. Один штрих из живых и один штрих из мертвых клеток были заражены кусочком пленки миксококка. Два других служили контролями.

Вопреки ожиданию живые клетки лизировались гораздо скорее, чем мертвые, и развитие миксококка на штрихе, состоящем из живых клеток, как это видно на рис. 4, происходило значительно быстрее. Особенно резкая разница наблюдалась в опытах со стафилококком. Мертвые клетки последнего были почти непригодны для миксококка, тогда как живые служили прекрасной пищей. Следовательно, миксококк способен растворять как мертвые, так и живые клетки бактерий. Происходит ли полное уничтожение, «поедание» всех клеток тест-микроба? Клетки миксококка имеют совершенно иную морфологию, чем клетки B. coli, и еще больше отличаются по своей форме от стафилококка.

Это давало возможность выяснить этот вопрос путем последовательной микроскопии материала, взятого из штриха, находящегося в различных стадиях «поедания». Тщательные исследования не позволяют обнаружить в зонах роста миксококка клеток тест-микроба. Это касается как микроскопии живого материала, так и исследования фиксированных и окрашенных препаратов. Однако при посеве клеток миксококка, взятых из тех же мест, где раньше находились клетки стафилококка или кишечной палочки, в мясо-пептонный бульон почти постоянно наблюдался рост кишечной палочки и стафилококка. Такая проверка на «полное растворение» клеток тест-микробов в данном случае облегчалась тем, что миксококк не растет на мясо-пептонном бульоне, куда производились высевы. Повидимому, единичные клетки, не обнаруживавшиеся при микроскопии, а возможно и жизнеспособные «осколки» бактерии сохранялись в зонах роста миксококка и, попадая в жидкую среду, давали рост. Однако количество таких жизнеспособных элементов ничтожно, если мы учтем то огромное количество клеток, которое содержится в массивном штрихе, сделанном на поверхности среды. Полное отсутствие стафилококка, так легко распознаваемого в окрашенных препаратах, это полностью подтверждает. Изучение микроскопических картин, сопровождающих питание клеток миксококка клетками других бактерий, дает сравнительно немного. Миксококк образует на поверхности плотной среды характерный для миксобактерий «фронт клеток», который активно перемещается по субстрату. Эта стадия «роения» или «псевдоплазмодия» резко отличает всех миксобактерий от истинных бактерий (Eubacteriales), у которых увеличение колонии обусловлено делением клеток, находящихся в колонии, а не активным распространением клеток по поверхности плотной среды. Край колонии миксококка, имеющий при небольших увеличениях фестончатый или слегка зубчатый характер, как бы проникает в толщу клеток другого вида бактерий. Только после непосредственного соприкосновения клеток миксококка и клеток бактерии, которой питается миксококк, начинается лизис. По мере увеличения числа характерных удлиненных клеток миксобактерии число клеток другого вида бактерии убывает. Следовательно, вначале преобладают клетки тест-микроба, затем их число уравнивается, еще позже оно уменьшается и, наконец, в препарате бывают видны только клетки миксококка. Все это можно наблюдать, микроскопируя материал, взятый из одного и того же места, но в разное время. При исчезновении клеток тест-микроба не было видно ни зерен детрита ни инволюционных форм, принадлежащих этому виду, т. е. не было видно тех микроскопических картин, которые наблюдала Солнцева, изучавшая лизис фитопатогенных бактерий, вызываемый миксобактериями. Если такая «дезагрегация» бактериальных клеток в этом случае и наблюдается, то она протекает незаметно. Возможно, конечно, что для констатации происходящих изменений необходимо не брать материал из зон лизиса, а изучать этот процесс под контролем глаза на агаровых блоках, находящихся во влажных камерах. Однако эти исследования, как мы имели возможность убедиться, довольно сложны, так как миксобактерии размножаются гораздо медленнее истинных бактерий.

О механизме действия

Результаты описанных выше опытов доказывали, что клетки миксококка прекрасно размножаются и дают нормального вида колонии, используя в качестве единственного источника питания клетки других бактерий. Естественно, что вначале клетки микробов, служащих пищей, должны быть убиты, а затем плазма клеток «предварительно переварена», т. е. превращена под влиянием ферментов миксобактерий в растворимые соединения, которые уже могут быть усвоены клетками миксо-

кокка. Таким образом, двухмоментность этого процесса явилась рабочей гипотезой в экспериментах по расшифровке механизма литического действия. Вполне логично было думать, что в культуре миксококка образуются и накапливаются вещества, действующие токсически на клетки других бактерий. С целью проверить это предположение миксококк был посеян в колбы Эрленмейера с жидкой картофельной средой. Через пять дней в культуру миксококка была дополнительно посеяна B. coli. Уже на следующий день среда стала мутной, что было связано с интенсивным развитием кишечной палочки, так как миксококк, размножаясь в жидкой среде, не вызывает ее помутнения. Эти данные можно объяснить тем, что количество клеток миксококка в силу особенностей его роста невелико и вследствие этого концентрация антагонистически действующих веществ, образуемых миксококком в жидкой среде, ничтожна. При одновременном посеве в ту же среду миксококка и кишечной палочки последняя развивается вначале, но на седьмые сутки в пробирке появляется типичная для миксококка пленочка и рост на поверхности стенок колбы. Следовательно, в жидкой среде миксококк не способен убивать других микробов, они не могут быть использованы им в качестве источника питания.

В дальнейшем проводились исследования, связанные с обнаружением веществ, выделяемых клеткой миксококка и действующих на клетки микробов. Исследования начаты с пропускания через фильтр Зейтца культуры миксококка, выращенной на жидкой картофельной среде. Фильтратом десятидневной культуры пропитывались стерильные кружки фильтровальной бумаги, которые помещались на поверхность плотной среды, только что засеянной B. coli. На следующий день вся поверхность среды покрывалась налетом из клеток кишечной палочки, но зон лизиса или задержки роста вокруг бумажных кружков не было совершенно. Опыты были повторены с культурой миксококка, предварительно сгущенной в два раза под вакуумом при 35—40°, а затем профильтрованной. Однако и эти опыты дали отрицательные результаты. Далее была произведена обработка фильтрата 13-дневной культуры миксококка эфиром, который добавлялся в количестве 25% от объема фильтрата. После экстрагирования эфирная вытяжка испарялась и к остатку добавлялся 1 мл воды. Затем три капли этого раствора вносились в 0,5 мл взвеси клеток B. coli. Однако никакого угнетающего действия на кишечную палочку не было — она прекрасно развивалась. Следующая попытка сконцентрировать активное начало была осуществлена с помощью замораживания фильтрата культуральной жидкости при —5, —10°. Замерзшая жидкость удалялась, а оставшийся на дне чашки осадок растворялся в небольшом количестве воды и добавлялся к взвеси клеток кишечной палочки в мясо-пептонном бульоне. Задержки роста B. coli также не было. Возникло предположение, что активное вещество может быть осаждено вместе с белками. В связи с этим к фильтрату 16-дневной культуры миксококка был добавлен сернокислый аммоний в количестве 60 г на 100 мл фильтрата. Полученный после фильтрации осадок высушивался, и порошок наносился на живой газон B. coli. Однако в тех участках газона, куда был нанесен порошок, ни лизиса клеток, ни торможения роста не происходило. Отрицательные результаты, полученные с культурами миксококка на жидкой среде, побудили перейти к извлечению активных веществ из плотных сред. Для этого миксококк выращивался в течение 10 дней на картофельном агаре, а затем плотная среда нарезалась небольшими кусочками, из которых производилась экстракция в течение суток эфиром, спиртом или водой. С целью получить доказательные данные экстрагированию подвергалось большое количество агаровой среды малым количеством жидкости. Обычно 5 г нарезанной плотной среды экстрагировались 5 мл спирта, эфира или воды. Из спиртовых или эфирных экстрактов спирт

или эфир испарялись феном, а осадок растворялся в небольшом количестве воды. Этот раствор, как и раньше, прибавлялся к взвеси клеток кишечной палочки в мясо-пептонном бульоне. Во всех без исключения случаях рост кишечной палочки не задерживался.

Исследования с экстрактами были дополнены опытами, в которых была применена растертая пленка миксококка. Схема опытов была следующая. Снятая с поверхности 11-дневной жидкой культуры пленка миксококка в одном опыте сразу тщательно растиралась в ступке со стеклянной «пудрой», в другом опыте — после предварительного часового пребывания ее в эфире. В последнем случае эфир вначале испарялся. Затем измельченные пленки наносились в определенных участках на живой газон B. coli. В одной контрольной чашке была нанесена стеклянная «пудра» без пленки, в другой — кусочки живой, не растиравшейся со стеклянной «пудрой» пленки миксококка. Все эти опыты дали отрицательные результаты. Растирая клетки, не удается «освободить» вещества, вызывающие растворение клеток. Только в тех чашках, где на газон были нанесены кусочки живой пленки, наблюдался рост миксококка и зоны лизиса.

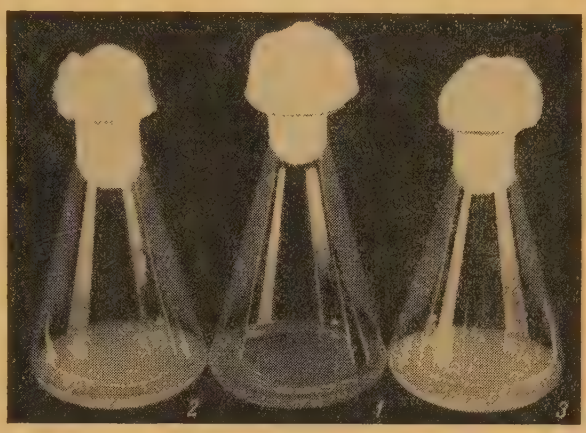


Рис. 5. Клетки миксококка могут размножаться за счет мертвых клеток B. coli, находящихся в жидкости. В центре колба, в которой произошло растворение клеток кишечной палочки. Справа — водная взвесь клеток B. coli, незараженная (контроль). Слева — взвесь клеток кишечной палочки, зараженная культурой Bact. fluorescens liquefaciens, образующей протеазы. Лизиса клеток нет

Таким образом, из культур миксококка, выросших как на жидких, так и на плотных питательных средах, не удается получить вещества, убивающие и растворяющие клетки. Проведенные исследования носили ориентировочный характер, и было бы преждевременно утверждать, что при других методах обработки культур нельзя будет выделить вещества, убивающие клетки бактерии.

Гораздо проще объяснить механизм второй фазы питания миксококка, именно — растворение клеток бактерий, служащих пищей. Клетки миксококка выделяют в среду активную экзопротеазу, в чем легко убедиться, выращивая культуру миксококка на картофельной желатине. В таких культурах происходит интенсивное разжижение желатины. Следовательно, миксококк, обладая комплексом активных протеаз, способен вызывать лизис мертвых клеток бактерий. Такой вывод, сделанный только на основании общих соображений, нашел себе подтверждение и в соответствующих экспериментах. Последние заключались в следующем. В серию чашек Петри с мясо-пептонным агаром производился посев культуры B. coli. Через двое суток бактериальный налет смывался с поверхности плотной среды физиологическим раствором поваренной соли. Полученная таким путем густая взвесь клеток кишечной палочки наливалась тонким слоем в колбы Эрленмейера, колбы стерилизовались при 115° в течение 20 мин., а затем заражалась миксококком. Посевы выдерживались в термостате при 30°. По мере развития пленки миксококка происходило просветление среды, и через 12 дней содержимое колб стало совершенно прозрачным. Это говорило о том,

что мертвые клетки B. coli были использованы в качестве единственного источника питания. Они были растворены и продукты их гидролитического расщепления были употреблены для синтеза протоплазмы миксококка. Однако это растворение обусловлено особым комплексом протеаз, так как не все бактерии, обладающие экзопротеазами, способны растворять мертвые клетки кишечной палочки. При добавлении к взвеси клеток B. coli культуры Bact. fluorescens liquefaciens растворения клеток кишечной палочки не происходит. Все сказанное хорошо иллюстрируют колбы, изображенные на рис. 5. Колба, находящаяся в центре, содержит размножившиеся клетки миксококка. Среда прозрачна, так как все клетки B. coli растворены. В колбе, находящейся слева, имеется взвесь клеток кишечной палочки и культура Bact. fluorescens liquefaciens. Растворенных клеток нет совершенно. Справа — колба с мутным содержимым, так как в ней взвесь мертвых клеток B. coli. Эта колба вообще не была заражена культурами других микробов (контроль).

Эти опыты с несомненностью доказывают, что образование протеаз миксококком в жидкой среде происходит в количестве, достаточном, чтобы «переварить» мертвые клетки кишечной палочки. Однако эти ферменты не действуют на живых бактерий, и взвесь живых клеток B. coli, как это показали соответствующие эксперименты, не просветляется, так как лизис не наступает.

Заключение

Взаимоотношения между миксококком и бактериями, служащими для него пищей, носят своеобразный характер. Миксококк не выделяет активных бактериостатических веществ в среду; это доказывается тем, что в жидкой культуре миксококка прекрасно развивается тот вид микроба, который используется им как источник питания. Следовательно, это необычное угнетение роста одного вида бактерии продуктами жизнедеятельности других видов, столь часто встречающееся в мире микробов. Механизм действия здесь, повидимому, несколько иной. Было бы неверным считать, что воздействие миксококка на других бактерий основано не на влиянии особых веществ, выделяемых клеткой миксококка, однако тонкий механизм самого воздействия здесь, очевидно, весьма своеобразен. Наиболее вероятно, что клетки микроба выделяют токсические вещества, не диффундирующие в жидкость, а образующие «ядовитую зону» вокруг клетки. Это наиболее экономный способ расходования «веществ химического нападения». Благодаря связи со слизистым слоем оболочки миксобактерии эти вещества не поступают в окружающую среду и их концентрация непосредственно вокруг клетки достигает высокого уровня. Хотя аналогия и не всегда убедительна, но здесь невольно вспоминается, что ряд необычайно трудно разлагаемых веществ, например хитин или целлюлоза, разлагается миксобактериями только при непосредственном контакте клеток с этими веществами. В культуральной жидкости до сих пор не удалось доказать присутствие ферментов хитиназы или целлюлазы. Следовательно, для гидролиза данных веществ также необходимо воздействие экзоферментов, находящихся на поверхности клеток и действующих при соприкосновении клетки с разлагаемым субстратом. Есть все основания предполагать, что и при питании миксобактерий клетками живых бактерий необходим контакт между клетками и воздействие веществами, выделяемыми миксококком, на клетки бактерий. Влияет ли при этом специальное токсическое вещество, убивающее клетку, или специальные ферменты (например, гиалуронидаза) на оболочку бактерий таким образом, что она становится доступной для действия протеолитических ферментов,— все это могут выяснить только дальнейшие исследования. Несомненно, что живые клетки должны быть подвергнуты воздействию высокой кон-

центрации какого-то вещества. В пользу этого говорит отсутствие лизиса в жидкости, содержащей живые клетки бактерий, а также результаты микроскопических исследований, проводившихся при изучении явлений лизиса. Напомним, что растворению клеток бактерий всегда предшествовало приближение клеток миксококка к этим клеткам и только после непосредственного контакта, протекавшего определенный промежуток времени, наблюдалось растворение клеток.

Описанные выше эксперименты с несомненностью доказывают способность миксококка питаться клетками других микробов. Многое в биологии миксобактерий становится теперь более ясным. Легко объяснить, почему миксобактерий считали за копрофильные организмы и рекомендовали выделять их из почвы с помощью методики, сущность которой заключалась в том, что на поверхность почвы раскладывался кроличий навоз. Теперь развитие миксобактерий можно объяснить тем, что в навозе имеется огромное число бактерий, служащих пищей для миксобактерий. Понятным становится также стимулирующий эффект, оказываемый посторонними бактериями на рост миксобактерий. В ряде случаев все дело сводилось к предоставлению дополнительно прекрасного источника питания. В экологическом отношении существенно, что многие миксобактерии, живя в почве, уничтожают клетки других видов микробов, так как миксобактерии более охотно «поедают» живые клетки бактерий, чем развиваются за счет растворенного органического вещества.

Значительный интерес представляет вопрос о характере взаимоотношений, существующих между микробом, питающимся клетками другого микроба, и микроорганизмом, клетки которого служат пищей. Можно ли рассматривать это явление только как частный случай антагонизма, так усиленно изучаемого в последнее время? Повидимому, нет. Существенным в данном случае является то, что здесь не происходит просто угнетение роста клеток другого вида микробов, а клетки убиваются и затем используются в качестве источника пищи. С другой стороны, это явление ничего общего не имеет с явлением лизиса, которое наблюдается у микробов под влиянием ряда спороносных бактерий. В этом случае спороносные формы не могут питаться живыми клетками другого вида. Рассматривать отношение миксококка к клеткам других микробов как паразитизм также нет оснований. Паразит, как правило, не стремится к быстрой гибели организма хозяина и во всяком случае не «съедает» все тело хозяина. Наиболее близко описанные в этой работе отношения стоят к хищничеству. Известно существование многочисленных протистов, питающихся клетками различных бактерий. Эти простейшие с полным основанием называются хищными, так как они захватывают, иммобилизуют жертву, а затем ее переваривают. Такое питание в сравнительно-физиологическом аспекте представляет собой частный случай внутриклеточного пищеварения. Одно из отличий, существующих между поведением культур миксобактерий, заключается в том, что последние переваривают клетки своих жертв внеклеточно. Для осуществления этого необходим тесный контакт клеток миксобактерий и клеток бактерий, служащих пищей. Следовательно, отсутствует только «заглатывание», наблюдаемое у протистов,— явление, в эволюционном отношении несомненно более позднего происхождения. Можно предполагать, что в своем простейшем виде хищничество не сопровождалось поглощением клетки, а ограничивалось ее убиванием и внеклеточным перевариванием. Такой примитивный тип хищничества в дальнейшем по мере усложнения структуры самих одноклеточных организмов стал более совершенным — клетки хищника получили возможность осуществлять «заглатывание» жертвы. Наиболее простой тип хищничества существует у миксобактерий, способных ассимилировать только растворимые вещества, проходящие через оболочку. В связи с этим следует указать, что,

переходя к более совершенной форме хищничества, сопровождающейся поглощением клеток бактерий, некоторые протисты сохраняют способность параллельно питаться осмотическим путем. Последний способ питания, за исключением случаев упрощения организации, связанной с паразитическим образом жизни, должен рассматриваться как более ранний.

Таким образом, способность клеток миксобактерий питаться живыми клетками других видов бактерий правильнее рассматривать как примитивный тип хищничества. Повидимому, это явление широко распространено в природе, и оно оказывает влияние на распространение и деятельность микроорганизмов, обитающих в почве и водоемах. Такой хищнический образ жизни связан с особым типом питания и получением энергии, и поэтому данную группу микробов правильнее выделить и назвать их бактериотрофными микроорганизмами. Из особенностей их физиологии наибольший интерес представляет избирательное питание живыми, а не мертвыми клетками бактерий, а также способность использовать в качестве источника пищи самые разнообразные виды бактерий

Выводы

1. Среди миксобактерий широко распространена способность вызывать лизис клеток других бактерий. Проведенные исследования выяснили, что клетки миксококка способны лизировать 10 видов различных бактерий. Не лизируются бактерии, образующие слизистые капсулы, что лишний раз подтверждает приспособительный характер последних.

2. Явления лизиса связаны с тем, что миксококк может использовать в качестве единственного источника питания и энергии живые клетки других бактерий. Мертвые клетки тех же видов бактерий — пища, менее пригодная для миксококка, чем живые клетки.

3. Можно предполагать, что процесс питания состоит из двух фаз. Вначале клетки бактерий убиваются особыми веществами, а затем с помощью протеолитических ферментов перевариваются. Клетки миксококка не могут питаться бактериями, находящимися в жидкой среде, так как необходим тесный контакт между миксококком и бактериями, служащими пищей. Такой контакт достигается только на поверхности плотной питательной среды.

4. Выделить из культур миксококка вещества, действующие антагонистически на других бактерий, не удается. В противоположность этому образующиеся в культуре миксококка протеазы весьма активны и их присутствие обнаруживается легко.

5. Взаимоотношения, существующие между миксококком и другими бактериями, носят иной характер, чем антагонистические отношения, в основе которых лежит угнетение размножения одного вида другим. Питание живыми клетками ближе всего стоит к хищничеству, и поэтому микроорганизмы, обладающие этой способностью, следует назвать бактериотрофными.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 25. VI. 1950 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. Экология пигментных микроорганизмов. II. Антагонистическое действие пигментов. Микробиология. XVI, 3, 1947.
2. Имшенецкий А. и Солнцева Л. Об аэробных целлюлозных бактериях. Изв. АН СССР, серия биологическая, 1115, 1936.
3. Солнцева Л., О лизисе фитопатогенных бактерий, вызываемом Myxobacteriales. Микробиология, VIII, 700, 1939.
4. Beeb I. Studies on the Myxobacteria. Jowa St. Coll. Journ. of Sci., **15**, 307, 1941.
5. Pinoy P. Sur les myxobacteries. Ann. Inst. Past., 35, 487, 1921.
6. Singh B. Myxobacteria in soils and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria. Journ. Gen Microb., **1**, 1, 1947.

ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ

Я. П. Худяков и *Ю. М. Возняковская*

Полезащитное лесоразведение как существенная часть Сталинского плана преобразования природы поставило перед наукой много задач. От их быстрого и правильного решения зависят успехи выращивания древесных пород в условиях степи. Одной из таких задач является изучение микотрофного питания древесных растений и обеспечение этих растений микоризными грибами в новых районах произрастания.

Известно, что многие древесные породы по своему типу питания микотрофны и могут нормально развиваться только в симбиозе с микоризным грибом путем образования на корнях микоризы. Особенно большой интерес представляют дуб и сосна как одни из главных пород в полезащитном лесоразведении, у которых степень микотрофизма резко выражена.

По литературным данным и по нашим наблюдениям, безмикоризные сеянцы развиваются значительно хуже микоризных. Однако часто на корнях сеянцев этих растений в степных районах микориза не образуется, если она не внесена при посеве.

Вопрос о микоризе древесных пород давно интересовал исследователей. Первые работы, установившие наличие микоризы на корнях растений, были опубликованы русским ученым Каменским еще в 1881 г. С тех пор по этому вопросу появилось много работ как у нас, так и за рубежом, но, несмотря на это, микориза еще недостаточно изучена.

Есть два пути обеспечения древесных пород микоризой: 1) применение микоризной земли из леса с одноименными породами; 2) применение микоризных грибов в виде препаратов чистых культур.

Использование микоризной земли имеет существенные недостатки, с которыми, однако, временно приходится мириться. Недостатки эти следующие: во-первых, вместе с полезными микоризными грибами в лесной почве могут содержаться и вредные организмы, перенесение которых в новые районы нежелательно; во-вторых, использование микоризной земли осложняется необходимостью переброски ее на большие расстояния и в значительных количествах из лесов в степные районы.

Чистые культуры микоризных грибов (практическое использование которых до сего времени не было возможно благодаря тому, что их культивированием еще в необходимой степени не овладели) имеют несомненные преимущества перед микоризной землей.

Применяя чистые культуры, можно произвольно создавать определенного типа наиболее желательные микоризы, управлять ими. Можно достигнуть большой транспортабельности препаратов.

Получение чистых культур необходимо также для изучения закономерностей взаимоотношения гриба с высшим растением при их симбиотрофизме.

Выделение и выращивание чистых культур этих грибов сопряжено с рядом трудностей, благодаря которым на первых этапах работа в этом направлении была недостаточно точной, в результате чего, вместо микоризных грибов, зачастую выделялись немикоризные почвенные сапрофиты (Moller [7]).

В дальнейшем некоторым авторам (Melin [6], How [5], Частухин [4] и др.) удалось получить чистые культуры микоризных грибов

для сосны, а также установить принадлежность грибницы микоризы к шляпным грибам, чем были подтверждены предположения Воронина по этому вопросу, сделанные им еще в 1886 г. Для дуба культуры микоризных грибов не были получены. Мы, начиная работу по получению чистых культур микоризных грибов, ставили перед собой задачу — дать простой метод обеспечения микоризой сеянцев дуба и сосны в степных районах при полезащитном лесоразведении, т. е. в тех районах, в которых почва или очень бедна гифами микоризных грибов, или даже вовсе их не содержит.

Начав выделение чистых культур микоризных грибов, мы убедились, что общеизвестные методы для решения этой задачи непригодны. Попытка воспользоваться в этом отношении методикой Melin не привела нас к нужным результатам. Мы не смогли получить роста микоризных грибов с кончиков корешков, промытых в растворе сулемы.

Методика выделения культур

Чтобы иметь уверенность в принадлежности выделенных культур к микоризным грибам, не прибегая к громоздкому методу получения микоризы на сеянцах, мы пользовались для выделения определенным исходным материалом. Особенно удобным является посев из гимениального слоя шляпных грибов, содержащего базидиоспоры. Этот слой до момента открытия семенных трубочек бывает стерилен, поэтому при взятии кусочка с излома прокаленным ланцетом получаются совершенно чистые посевы. Кроме этого объекта, для выделения чистых культур микоризных грибов мы пользовались материалом, извлеченным с помощью микроманипулятора с микоризных корней. Техника состояла в следующем: свежевзятые корешки дуба с хорошо выраженными грибными чехликами (коралловидные образования) промывались несколько раз в стерильной воде и растирались в стерильной ступочке, при слабом надавливании пестика, в небольшом количестве воды. Полученная таким образом взвесь состояла из кусочков микоризных чехликов различной величины, похожих при рассматривании с небольшим увеличением микроскопа на стенки плетеной корзинки. Кроме кусочков чехликов, в взвеси встречались обрывки разной величины светлых и темных гиф.

Весь этот материал распределялся по поверхности водного агара, налитого в чашки Петри. Агар приготовлялся для этой цели не очень плотный (1%), так как с него при подведении стеклянной иглы микроманипулятора удобнее брать нужный объект. Взятие кусочка чехлика или гифы делалось под контролем глаза, поэтому возможность посева загрязнителей была минимальной.

После того как желаемый объект попадал на иглу микроманипулятора, кончик ее обламывался непосредственно на питательную среду или, что еще удобнее, на платиновую петлю, увлажненную для прилипания отрезка иглы каплей стерильной воды; этот кончик стеклянной иглы затем уже с помощью петли переносился на агар.

Практика показала, что для выделения культур удобнее пользоваться агаризированной питательной средой, разлитой косым слоем в пробирки. При длительном выдерживании посевов микоризных культур в термостате в пробирках среда меньше подвержена подсыханию и загрязнению. Для того чтобы не происходило загрязнения посевов бактериями, среда подкислялась лимонной кислотой до pH = 4,0.

Выращивание культур

Биология и физиология микоризных грибов до настоящего времени мало изучены. Поэтому подбор состава питательной среды для их вы-

ращивания представлял затруднения. На первом этапе работы мы пытались использовать питательные среды из естественных субстратов или с добавлением их. Так, мы брали отвар листьев дуба, вытяжку из корней, проростки желудей, желуди, отвар из сухих грибов и, кроме того, ряд растительных сред — морковную, овсяную, сенную.

Выделение культур на всех этих средах было безуспешно, поэтому в дальнейшей работе мы остановились на так называемой синтетической среде, которая имела точно определенный химический состав. Варьируя состав этой среды, можно было подойти к изучению потребности микоризных грибов в различных питательных веществах.

Многие микроорганизмы, как известно, относятся к аминогетеротрофным организмам, им недостаточно в качестве азотистого питания одних аммонийных солей, а требуется набор определенных аминокислот.

Известно также, что биосинтетическая способность в отношении витаминов не у всех микроорганизмов одинаково выражена.

Учитывая это, мы, наряду с источниками углерода, азота и минеральных солей, в среду включали набор аминокислот в виде гидролизата безвитаминного казеина в концентрации 0,5% и триптофан, разрушающийся в процессе гидролиза. Кроме того, в среду был добавлен набор различных витаминов и микроэлементов.

Состав среды был следующий:

Дестиллированная вода	1 л	NaCl	0,1 г
Глюкоза	15 г	$FeCl_2$	0,6 мг
NH_4NO_3	1 „	Гидролизат казеина	5,0 г
KH_2PO_4	1 „	Агар	15,0 „
$MgSO_4$	0,5 „		
$CaCl_2$	0,1 „		

Микроэлементы

$CuSO_4$	0,23 мг	$MnCl_2$	0,046 мг
$Na_2B_4O_7$	0,045 „	$ZnSO_4$	4,3 „
Na_2MoO_4	0,043 „		

Витамины до 1,0 мг на литр

Никотиновая к-та	Рибофлавин
Пиридоксин	Сепантотенат кальция
Фолиевая к-та	Биотин
Парааминобензойная к-та	Тиамин

Дальнейшие исследования показали, что микоризные грибы не нуждаются в витаминах при последующих пересевах.

На эту синтетическую среду мы производили посев микоризных грибов вышеописанным способом. В результате посевов из гимениального слоя шляпных грибов был получен рост мицелия Boletus edulis (белый гриб), Boletus luteus (масленок), Boletus variegatus (моховик) и Boletus luridus (дубовик). Грибы пересеваются в течение 10 месяцев, хотя дают не особенно пышный рост.

Посевы из других источников были менее удачны. Так, при многократных посевах кусочков микоризного чехлика рост удалось получить только в одном случае, что можно объяснить неподходящим временем выделения — лето (Рейнер и Джонс [3]). Рост появился на кончике капилляра на 37-й день после посева. Выросла колония темного цвета с коротким серым пушком, которая при дальнейшем описании будет обозначена как «серая» или № 6. Остальные посевы оставались стерильны, загрязнений не было.

Посев темных гиф был более успешен. Из серии посевов в четырех случаях удалось вырастить культуру, которая была во всех этих случаях однотипна и представляла собой желтую, похожую на серный

цвет колонию (рис. 1, *5*). В одном случае на 30-е сутки выросла культура черного цвета. Внешний вид выделенных культур представлен на рис. 1.

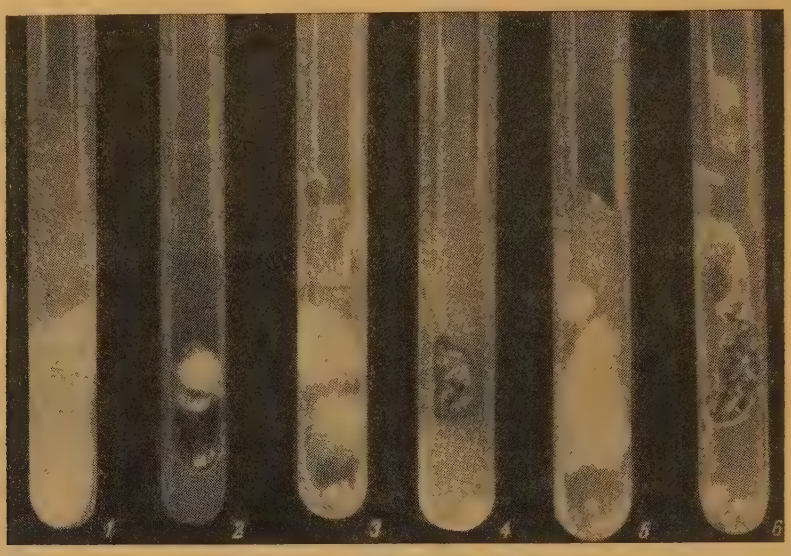


Рис. 1

1 — Boletus luteus (масленок); *2* — Boletus luridus (дубовик). Пигмент окрашивает среду в коричневый цвет; *3* — Boletus variegatus (моховик); *4* — серая; *5* — желтая; *6* — черная. Культуры серая, желтая и черная получены из микоризы дуба и каждая выделена микроманипулятором из одной гифы

Описание культур

1. Boletus luteus (масленок) растет на среде в виде белоснежного пуха; воздушный мицелий длинный, плотный. С течением времени колония снизу начинает темнеть и приобретает коричневый цвет, а еще позднее темнеет и воздушный мицелий. Культура врастает в среду и трудно разъединяется петлей.

Вид мицелия под микроскопом представлен на рис. 2. Гифы имеют в среднем диаметр 3,0 μ, септированы. Органов плодоношения в культуре не появляется. С течением времени при старении гифы становятся зернистыми и некоторые из них окрашиваются в розовый цвет.

2. Boletus luridus (дубовик) на среде растет очень медленно. Выделяет коричневый пигмент, окрашивающий среду в темный цвет. Центр колонии плотный, выпуклый, снизу вросший в агар. Сверху колония опушена воздушным мицелием белым или коричневатым. Диаметр гиф в среднем равен 3,4 μ (рис. 3).

3. Boletus variegatus (моховик) — рост на среде не обильный, колония, как и дубовика, в центре выпуклая, плотная, покрыта сверху мицелием, расходящимся радиально и часто дающим длинные мицелиальные тяжи, которые состоят из гиф, сплетенных в жгуты. Образует желтый пигмент, диффундирующий в агар. Мицелий белый. Диаметр гиф 3,1 μ (рис. 4).

4. Культура № 6 (серая). Характерным для этой культуры является то, что она на агаре образует массу в виде выпуклого неровного образования черного цвета, как бы состоящего из глыбок, покрытого сверху коротким бархатистым серым пушком (рис. 1, *4*). Колония очень плотная. Морфологически состоит из довольно толстых гиф, имеющих средний диаметр 3,4 μ, который у отдельных гиф достигает 5 μ. Гифы окрашены в серый цвет, хорошо очерчены, септированы. Через 20 суток сег-

Рис. 2. Boletus luteus (масленок)

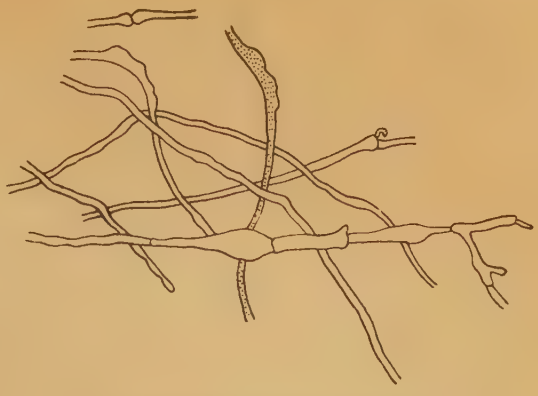


Рис. 3. Boletus luridus (дубовик)

Рис. 4. Boletus variegatus (маховик)

Рис. 5. Культура № 6 (серая)

ментируются, но на отдельности не распадаются. Микроскопический вид представлен на рис. 5.

5. Культура № 5 (желтая) — цвет колонии лимонножелтый, покрыта бархатистым налетом. Центр колонии неровный, выпуклый, твердый; на некоторых средах он приобретает серый цвет, становится «голым».

Рис. 6. Культура № 5 (желтая)

Рис. 7. Культура № 7 (черная)

Микроскопически гифы очень тонкие, диаметром 1,8 μ и тоньше. В плотной части колонии гифы сплетены в тяжи. В некоторых условиях наблюдаются образования типа хламидоспор и утолщение гиф (рис. 6).

6. Культура № 7 (черная) названа так по цвету колоний, который наблюдался в момент ее выделения (рис. 1, *б*). В дальнейшем в молодом возрасте эта культура имела белую глянцевую поверхность, лишенную воздушного мицелия. С возрастом колония темнеет и на ней появляются щетинки типа коремий. Растущий край колонии остается белым. Культура хорошо перевивается. Морфологически состоит из очень тонких гиф — 1,7—0,8 μ. На некоторых средах гифы полностью распадаются на оидии уже на 15-е сутки. Диаметр оидий 2,3—2,6 μ (рис. 7).

Все выделенные нами культуры микоризных грибов при всем их различии имеют некоторые общие характерные для них признаки. К таким признакам можно отнести:

1) значительную плотность колоний; 2) образование сплетений гиф в виде жгутов, характерных для гименомицетов; 3) отсутствие роста на обычных для низших грибов питательных средах; 4) характерный

запах свежих шляпных грибов при растирании мицелия; 5) очень медленный рост мицелия на искусственных питательных средах; 6) образование пряжек на гифах; 7) отсутствие образования каких бы то ни было органов плодоношения; 8) потребность в некоторых аминокислотах.

В культурах № 6 и 7 в наших условиях пряжек не обнаружилось, не всегда они имелись и в культуре Boletus luteus.

Выводы

1. Получены чистые культуры микоризных грибов. Четыре культуры выделены из плодовых тел рода Boletus: B. edulis, B. luteus. B. luridus, B. variegatus. Три культуры выделены с помощью микроманипулятора из одной гифы с микоризных корешков.

2. Выяснено, что выделенные микоризные грибы являются аминогетеротрофами и требуют наличия в среде некоторых аминокислот.

3. Выделенные культуры разных видов микоризных грибов, несмотря на значительные их различия, имеют целый ряд общих признаков, характерных для гименомицетов.

Московское отделение
Всесоюзного института сельскохозяйственной
микробиологии

Получено 24. VI. 1950 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронин М. С. Ueber die sogenannte Pilzwürzel (Mycorrhiza) von Frank. Ber. Deutsch. Bot. Ges., III, 1885.
2. Каменский Ф. М. О симбиотическом соединении мицелия грибов с корнями высших растений. Тр. Спб. об-ва естествоиспыт. XVII, вып. 1, 1886.
3. Рейнер М. и Нельсон-Джонс В. Роль микориз в питании деревьев. Москва, 1949.
4. Частухин В. Я. Пути внесения микоризообразующих грибов в лесные полосы. Природа, 4, 35, 1950.
5. How J. E. The Mycorrhizal relations of larch. Ann. Bot., IV, No. 13, 135, 1940.
6. Melin E. Untersuchungen über die Bedeutung der Baummycorrhiza. 1925.
7. Moller A. Mycorrhiza und Stickstoffernährung. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 24, 230, 1906.

ОБРАЗОВАНИЕ РАСТВОРИМЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ ЖИРА ASPERGILLUS NIGER

Г. Л. Селибер и *Н. А. Головкина*

По вопросу о механизме разложения жира микроорганизмами имеется ряд данных и теоретических предположений, но последние не всегда достаточно обоснованы, и многое в этой области подлежит дальнейшему исследованию. На наличие различных типов разложения жира указывалось ранее одним из нас (Селибер [2, 3, 4]), причем рекомендовалось обратить большее внимание на образование при этом органических кислот, переходящих в раствор.

Что касается Aspergillus niger, то известно, что при разложении жира этой плесенью может образоваться щавелевая кислота. Этот факт был установлен Wehmer [7] для оливкового масла и Schenker [6] для оливкового масла и олеиновой кислоты.

Задача настоящего исследования состояла в изучении образования щавелевой кислоты при разложении жира Asp. niger на средах с различными источниками азота. Наряду с этим производились изыскания на наличие в водном растворе других органических кислот, кроме щавелевой кислоты. Нам казалось целесообразным выяснить, не образуются ли при разложении жира грибами те же кислоты, что и при разложении сахара. Для этого фильтраты культур анализировались на наличие лимонной и глюконовой кислот. Исследования производились с двумя штаммами Asp. niger — с одним до 1941 г., с другим в 1946 г.

В состав питательной среды, кроме подсолнечного и оливкового масла в количестве 2 мл на 50 мл среды, входили следующие минеральные соли: Na_2HPO_4 — 0,1%, KCl — 0,05%, $MgSO_4$ — 0,03%, $CaCl_2$ — 0,01%. В опытах 1946 г. применялся минеральный раствор состава: K_2HPO_4 — 0,1%, $MgSO_4$ — 0,03%, $CaCl_2$ — 0,1%, NaCl — 0,1%; в качестве источника азота употреблялись: пептон (1%), фосфорнокислый аммоний, сернокислый аммоний и нитрат калия в количестве 0,2%.

Щавелевая и лимонная кислоты определялись по Буткевичу (Иванов [1]) по кальциевым солям. Глюконовая кислота определялась по кальциевой соли, которая осаждалась спиртом. Для проверки в ряде случаев кальций глюконата кальция осаждался щавелевокислым аммонием и глюконовая кислота определялась по щавелевой; обращалось также внимание на форму кристаллов глюконата.

В многочисленных произведенных опытах мы только три раза получили осадок на лимонную кислоту в количестве 840 мг, 1230 мг и 2610 мг на 100 мг среды, но идентифицировать кислоту нам не удалось; поэтому этот результат должен быть поставлен под сомнение.

Что касается щавелевой кислоты (опыты до 1941 г.), то наибольшие количества были получены на средах с KNO_3 (максимум 400 мг на 100 мл среды) и с пептоном (500 мг), но в последнем случае щавелевая кислота образуется не только за счет жира, но и за счет пептона. Среда с жиром и с $(NH_4)_2HPO_4$ может также дать относительно большие цифры (максимум 320 мг), но в общем эта среда дала меньшие цифры, чем пептон и нитрат калия.

Наименьшие цифры дала среда с жиром и с $(NH_4)_2SO_4$ (максимум 120 мг на 100 мг среды); в одном случае 11-дневная культура дала

только следы щавелевой кислоты. Результаты, полученные нами с этим источником азота, противоречат результатам исследований Jacquott [5] согласно которому мицелий, развившийся на среде с $(NH_4)_2SO_4$ и с сахаром, никогда не образует щавелевой кислоты; последняя образуется только в том случае, когда рост гриба сопровождается выделением осно-

Таблица 1

Образование щавелевой кислоты на среде с подсолнечным маслом

Среда с пептоном				Среда с $(NH_4)_2HPO_4$			
возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мг	возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мг
21 день	37,0	66,6	300	21 день	62,0	62,2	280
21 „	42,0	56,6	250	21 „	60,0	53,4	240
4½ недели	71,0	111,0	500	4½ недели	88,0	55,6	250
4½ „	44,0	88,8	400	4½ „	28,0	—	
7 дней	45,0	60,0	270	7 дней	19,0	6,7	30
14 „	35,0	46,6	210	14 „	30,0	11,2	50
7 „	35,0	35,6	160	21 день	30,0	11,2	50
7 „	24,0	44,4	200	10 дней	29,0	13,8	62
14 „	44,0	73,4	330	20 „	45,0	16,7	74
21 день	46,0	77,8	350 *	30 „	80,0	20,1	96
15 дней	12,0	65,0	293				
15 „	52,0	73,4	330				
21 день	50,0	77,8	350				
10 дней	39,0	56,2	253				
20 „	63,0	80,8	364				
30 „	57,0	80,0	360				

Примечание. Значение кислотности во всех таблицах дается с поправкой на кислотность контроля.

* На среде с одним пептоном без жира получилось 202 мг щавелевой кислоты.

Таблица 2

Образование щавелевой кислоты на среде с оливковым маслом

Среда с пептоном				Среда с $(NH_4)_2HPO_4$			
возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мг	возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты: в мг
7 дней	24,0	44,4	200	7 дней	23,0	3,1	14
14 „	25,0	37,8	170	14 „	39,0	17,6	80
21 день	40,0	48,8	220	21 день	85,0	55,6	250
21 „	60,0	78,2	352	21 „	104,0	23,1	104
10 дней	28,0	50,4	227	10 дней	33,0	24,0	108
20 „	62,0	80,0	360	20 „	53,0	20,8	94
30 „	58,0	82,6	372	30 „	58,0	24,9	112

Таблица 3

Образование щавелевой кислоты на среде с подсолнечным маслом

Среда с $(NH_4)_2HPO_4$				Среда с $(NH_4)_2SO_4$				Среда с KNO_3			
возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты		возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты		возраст	кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	к-во щавелевой к-ты	
		в мл 0,1 *N* NaOH	в мг			в мл 0,1 *N* NaOH	в мг			в мл 0,1 *N* NaOH	в мг
10 дней	25,0	8,9	40	10 дней	23,0	6,7	30	10 дней	22,0	28,8	130
2 м. 15 дней	62,0	26,6	110	2 м. 15 дней	19,0	6,7	30	2 м. 15 дней	49,0	88,8	400
10 дней	39,0	22,2	100	10 дней	59,0	26,7	120	10 дней	50,0	64,4	290
20 „	139,0	71,0	320	20 „	39,0	15,6	70	20 „	67,0	82,2	370
11 „	25,0	6,6	30	11 „	28,0	Следы		11 „	48,0	44,4	200
20 „	85,0	30,2	136	20 „	44,0	8,8	40	20 „	50,0	48,8	220

вания, которое должно быть нейтрализовано. Отметим, что наши опыты в ряде случаев показывают кислотность, превышающую кислотность образованной щавелевой кислоты. Это ставит вопрос о наличии в растворе другой или других органических кислот, кроме щавелевой (табл. 1, 2, 3).

Следует указать на образование небольших количеств щавелевой кислоты на среде с олеиновой кислотой и с $(NH_4)_2HPO_4$ в качестве источника азота (табл. 4).

Таблица 4

Образование щавелевой кислоты на среде с олеиновой кислотой и с $(NH_4)_2HPO_4$

Возраст	Кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	К-во щавелевой к-ты	
		в мл 0,1 *N* NaOH	в мг
1 м. 9 дн.	20	16,0	72
1 м. 19 дн.	26	14,4	64

Во многих случаях нами, наряду с щавелевой кислотой, была обнаружена глюконовая кислота; эта кислота была выявлена в средах с $(NH_4)_2HPO_4$ (26—458 мг на 100 мл среды), с $(NH_4)_2SO_4$ (максимум 350 мг), с KNO_3 (максимум 200 мг); она не всегда образуется наряду с щавелевой кислотой и ни разу не встретилась в культурах на среде с пептоном (табл. 5).

Опыты, поставленные в 1946 г. с другим штаммом гриба, подтвердили результаты, полученные до 1941 г., показав, что большие количества щавелевой кислоты могут образоваться при всех употреблявшихся нами источниках азота и что во всех случаях мы имеем, наряду с образованием щавелевой кислоты значительное понижение pH (табл. 6).

Таблица 5

Образование глюконовой кислоты на средах с подсолнечным маслом и различными источниками минерального азота

Среда с $(NH_4)_2HPO_4$		Среда с $(NH_4)_2SO_4$		Среда с KNO_3	
возраст	глюконовая к-та в мг	возраст	глюконовая к-та в мг	возраст	глюконовая к-та в мг
$4^1/_2$ нед.	260	2 м. 15 дн.	350	11 дней	200
10 дней	48	10 дней	350	20 „	138
20 „	136	11 „	360		
30 „	458	20 „	346		

Образование глюконовой кислоты на среде с оливковым маслом и $(NH_4)_2HPO_4$

Возраст	Глюконовая к-та в мг
10 дней	74
20 „	234
30 „	136

Таблица 6

Образование щавелевой кислоты

Возраст	Кислотность в мл 0,1 *N* NaOH	К-во щавелевой к-ты		pH	
		в мл 0,1 *N* NaOH	в мг	начальное	конечное
Среда с подсолнечным маслом и KNO_3					
36 дней	95			—	1,76
35 „	37	80,2	366	7,05	2,97
7 „	39	57,8	260	—	2,82
14 „	35	71,0	323	—	2,63
21 день	89	85,8	386	6,95	1,85
Среда с подсолнечным маслом и $(NH_4)_2HPO_4$					
36 дней	159	103,3	474	6,10	1,47
35 „	93	64,4	290	7,5	1,68
7 „	20	14,4	65	—	2,44
14 „	12	1,9	13,2	—	2,46
21 день	66	57,2	257	6,07	1,71
Среда с подсолнечным маслом и $(NH_4)_2SO_4$					
36 дней	127	41,0	185	5,95	1,51
35 „	27	—	Следы	6,87	2,01
7 „	—	—	—	—	—
14 „	44	26,7	119	—	1,98
21 день	146	91,6	412	6,24	1,67
Среда с подсолнечным маслом и с пептоном					
36 дней	154	99,4	438	6,74	1,47

Так, в среде с пептоном при конечном pH до 1,47 образовалось 438 мг, в среде с $(NH_4)_2HPO_4$ при конечном pH, равном 1,47—474 мг, в среде с KNO_3 при конечном pH, равном 1,85—386 мг, в среде с $(NH_4)_2SO_4$ при конечном pH, равном 1,67—412 мг. Начальный и конечный pH для всех поставленных нами опытов приведены в табл. 6.

В этих опытах во многих случаях также получались цифры общей кислотности, превышающие кислотность образованной щавелевой кислоты. Это показывает, что в культурах, наряду с щавелевой кислотой, имеется еще другая растворимая в воде органическая кислота.

Глюконовая кислота была обнаружена в опытах 1946 г. в небольших количествах в четырех случаях: дважды в культурах с KNO_3 (30 и 50 мг) и по одному разу в культурах с $(NH_4)_2HPO_4$ (20 мг) и с $(NH_4)_2SO_4$ (150 мг).

Приведенные выше результаты и данные прилагаемых таблиц показывают, что образование щавелевой кислоты не связано с необходимостью наличия оснований, которые должны быть нейтрализованы. Относительно большие количества щавелевой кислоты могут образоваться в культурах, в которых источником азота являются $(NH_4)_2HPO_4$ и $(NH_4)_2SO_4$. В этом отношении имеется разница между обоими штаммами, с которыми были произведены настоящие исследования. Штамм, с которым ставились опыты в 1946 г., дал бóльшие максимальные количества щавелевой кислоты с этими источниками азота, чем штамм, примененный в опытах до 1941 г.; следует указать, что и в 1946 г. имелись культуры с аммонийными солями с небольшими количествами щавелевой кислоты. Колеблющиеся цифры, полученные нами до 1941 г. и в 1946 г., не дают возможности сделать какие-нибудь заключения о динамике процесса образования и возможного потребления щавелевой кислоты.

Большие цифры общей кислотности, нередко значительно превышающие количество образованной щавелевой кислоты, свидетельствуют в пользу наличия в культурах одной или двух органических кислот, кроме щавелевой. Одной из таких кислот для ряда культур можно считать глюконовую кислоту. Наличие последней могло быть предпосылкой для предположения о возможности образования сахара при разложении жира, но наши поиски в этом направлении не привели к положительным результатам.

Выводы

1. На средах с растительным маслом (подсолнечным и оливковым) Asp. niger образует щавелевую кислоту при употреблении в качестве источника азота как пептона и нитрата калия, так и фосфорнокислого и сернокислого аммония. Это противоречит существующему взгляду, что образование щавелевой кислоты всегда связано с необходимостью нейтрализации выделяющихся при росте гриба оснований.

2. В ряде культур общая кислотность значительно превышала кислотность, соответствующую образовавшейся щавелевой кислоте. Это дает основание предполагать, что в растворе культуры находится еще другая органическая кислота. Полученные результаты показывают, что наряду с щавелевой кислотой при разложении жира грибом может образоваться и глюконовая кислота. Однако эта кислота обнаруживается не всегда.

3. Во всех средах разложение жира сопровождалось значительным понижением pH среды.

4. Вопрос о том, идет ли образование глюконовой кислоты через сахар или иным путем, остается открытым.

Естественно-научный институт
им. П. Ф. Лесгафта
Ленинград

Получено 20.IX.1949 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов Н. Н. Методы физиологии и биохимии растений, 4-е изд., стр. 214, 1946.
2. Селибер Г. Л. Образование и разложение жира микроорганизмами. Монография Научного института им. Лесгафта, стр. 49, Ленинград, 1926.
3. Селибер Г. Л. Разложение жиров некоторыми микроорганизмами. III. Разложение рыбьего жира и туберкулезного воска. IV. Некоторые наблюдения над влиянием состава среды на разложение жира микробами. Замечания по вопросу о механизме разложения жира микробами. Известия Научного института им. Лесгафта, XIII, вып. 1, 1927.
4. Селибер Г. La décomposition des graisses par les microorganismes. Труды II Международного конгресса почвоведов. III., 145, Москва, 1932.
5. Jacquot R. La fermentation oxalique. Mécanisme de l'oxaligénèse chez les mucédinées. Annales des fermentations, IV, № 5, 1938.
6. Schenker. Zur Kenntnis der Lipase von Aspergillus niger. Biochem. Z., 120, 164, 1921.
7. Wehmer C. Enstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Ztg., 41, 232, 1891.

О МЕТАБОЛИЗМЕ BACILLUS BOTULINUS

А. К. Родопуло

Возбудитель пищевого отравления Bacillus botulinus открыт в 1895 г. В природе найдено несколько типов Bac. botulinus: одни образуют токсин, вызывающий болезнь ботулизм, другие не токсичны. В настоящее время хорошо изучены его морфологические, культурально-биохимические и иммунно-биологические свойства. Что касается биохимии этого микроба, то мы имеем лишь несколько работ [1, 2, 3], которые по своему содержанию не охватывают этот сложный биохимический вопрос.

Задачей нашей работы является изучение метаболизма Bac. botulinus с установлением конечных продуктов углеводного и белкового обмена. Наряду с этим мы попытались установить промежуточные продукты углеводного обмена с целью выяснения специфики этого брожения.

Методика постановки опытов

Объектом для исследования был взят Bac. botulinus типа А. Питательной средой для выращивания этой культуры служил мясопептонный бульон с содержанием от 1 до 2% глюкозы и без глюкозы.

Среды помещались в 1 и 0,5-литровые склянки, которые закрывались ватными пробками. Склянки со средой после стерилизации в автоклаве под давлением 1,5 атмосферы в продолжение 30 минут выдерживались в термостате при 37° в течение 3 дней. По истечении этого времени среда нагревалась в течение $1^1/_2$ часа для удаления растворенного кислорода, что было достаточно для развития Bac. botulinus. Питательная среда имела низкий редокспотенциал (Eh = —0,006 мв).

После охлаждения до 40—50° производился обильный посев: на 0,5 л питательной среды вносилось 5 мл чистой культуры Bac. botulinus. Инокулированные склянки закрывались каучуковыми пробками с вставленными в них бродильными вентилями с концентрированной серной кислотой и помещались в термостате при 37°.

Методика определения

В нашей работе мы пользовались следующей методикой определения продуктов обмена. Предварительно ацетон и альдегиды отделяли от спиртов кислым сернистокислым калием. Бисульфитные производные альдегидов и ацетона разлагали углекислым кальцием и отгоняли под вакуумом, приемник охлаждали льдом. Вначале мы определяли альдегиды и ацетон иодометрическим способом. Затем ацетон отделяли от альдегидов нагреванием с 30%-ной щелочью с последующей отгонкой водяным паром. Ацетон определяли иодометрическим способом. По разности между первым и вторым определением вычисляли количество альдегидов. Идентификация ацетона производилась щелочным раствором синеродистой ртути и азотнокислого серебра. При наличии ацетона в количестве от 0,05 до 0,5 мг образуется муть от беловато-синего до белого цвета.

Этанол определяли иодометрически с нагреванием до 70°. Бутанол определяли окислением бихроматом и из общего количества спиртов

вычитали количество этанола, определяемого иодометрическим методом.

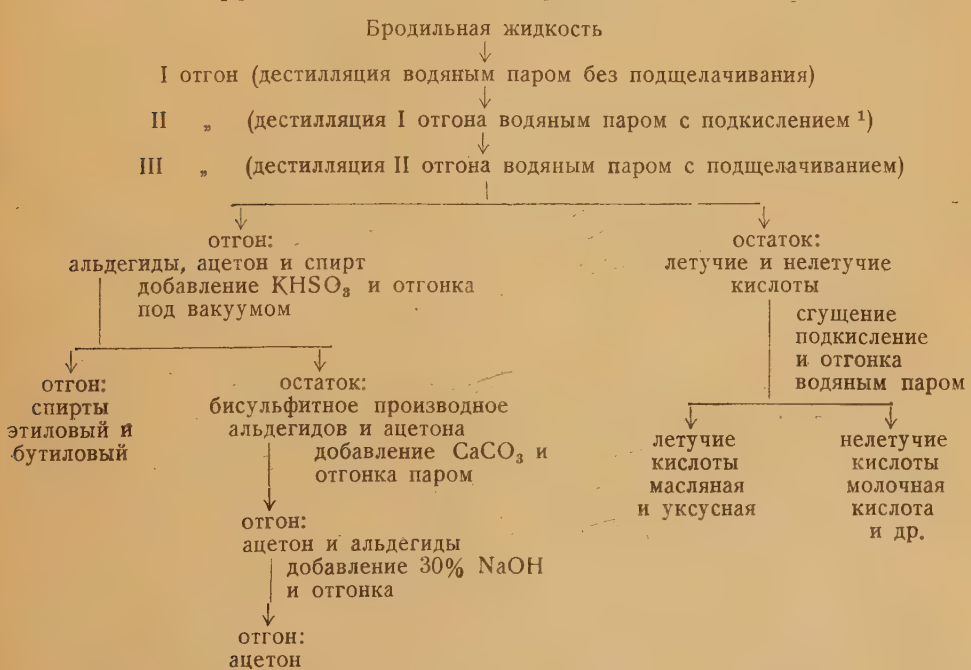
Масляная и уксусная кислоты определялись по методу Kline [4]. Сущность метода заключается в том, что вначале определяется общее количество уксусной и масляной кислот вместе. Затем, в отдельной пробе, масляная кислота окисляется в ацетон посредством перекиси водорода в присутствии катализатора железо-аммиачных квасцов, растворенных в серной кислоте. Полученный таким образом ацетон количественно определяли иодометрически и пересчитывали на масляную кислоту (так как из одной молекулы масляной кислоты получается одна молекула ацетона). Зная количество масляной кислоты, можно по разности определить количество уксусной кислоты. Масляная и уксусная кислоты идентифицированы в виде серебряных солей.

Методы фракционирования

На методе фракционирования бродильной жидкости мы останавливаемся более подробно, так как при применении принятой до сих пор схемы фракционирования мы не могли получить хорошие результаты.

Применяемая нами питательная среда, содержащая довольно много белковых веществ и глюкозу, после сбраживания имела темную окраску, и поэтому ее не удавалось сколько-нибудь точно нейтрализовать перед отгонкой некислых летучих веществ. Электрометрическое титрование мы не смогли применить из-за отсутствия специальных электродов. Конец нейтрализации не удавалось установить ни с помощью фенолфталеина, ни с помощью лакмуса. Этому мешала еще буферность белковых веществ. Реакция на лакмус была нейтральной, однако при отгонке ацетона из такой среды мы всегда получали повышенный выход ацетона, так как оставшаяся после брожения глюкоза дает со щелочью альдегиды и ацетоновые тела, реагирующие с иодом, что и приводило к увеличенным выходам ацетона.

Схема фракционирования бродильной жидкости



[1] Для связывания аммиака и аминов.

Было также установлено, что при пользовании обычной схемой фракционирования получается повышенное количество летучих кислот за счет гидролиза белковых веществ в присутствии серной кислоты. Кроме того, нам приходилось очищать первый дестиллат от продуктов распада белковых веществ (амины и аммиак), которые также мешали определению ацетона иодометрически.

Исходя из вышеизложенного, нам пришлось пересмотреть методику фракционирования бродильной жидкости, в результате чего была установлена схема фракционирования и определения продуктов брожения.

Динамика образования продуктов углеводного обмена

Брожение Bac. botulinus изучалось в мясопептонном бульоне с 2% глюкозы и на среде Тароции с 1 и 2% глюкозы. В бродильных сосудах по истечении 15 час. после посева наблюдалось помутнение жидкости и выделение пузырьков газа. К этому времени редокспотенциал достигал значения — 0,130 мв. Количество выделившегося газа устанавливалось взвешиванием через каждые 24 часа. Выделение газа достигает своего максимума через 40 час. после посева, после 88 час. выделение газа почти прекращается. Редокспотенциал устанавливался на уровне — 0,265 мв.

При микроскопии мазка из молодой культуры видно, что клетки имеют форму коротких палочек, соединенных попарно и короткими цепочками. В культурах после 88—112 часов брожения клетки утолщены, и изредка среди них наблюдаются клетки с субтерминально и центрально расположенными спорами, что показывает прекращение активного процесса. Первая проба для анализа бралась через 15 час. после посева, а следующие пробы брались через сутки. В каждой пробе определялись следующие продукты брожения: летучие кислоты, альдегиды, ацетон, этанол, pH и Eh среды, а также производились биологические пробы на токсин.

Результаты анализов приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Динамика образования продуктов углеводного обмена

(Данные в пересчете на 100 мл бражки)

Продолжит. инкубации в час	Газы в мг	pH до брожения 7,02	Eh до брожения —0,006 мв	Адельгиды в мг	Ацетон в мг	Этанол в мг	Бутанол в мг	Летучие кислоты, мл 0,1 N	Титр токсина в мл
15	60	6,95	—0,130	3,5	1,93	2,2	6,88	5,2	10^{-4}
40	140	6,69	—0,170	3,2	2,32	3,44	11,27	10,5	10^{-5}
64	170	6,03	—0,180	3,0	2,76	6,38	21,18	15,4	10^{-6}
88	140	6,00	—0,200	2,8	3,32	7,82	27,70	16,6	10^{-6}
112	190	6,00	—0,235	2,75	3,71	8,69	32,75	15,0	10^{-6}
136	190	5,95	—0,260	2,5	5,11	11,29	39,04	15,2	10^{-6}
160	190	5,87	—0,265	2,5	5,96	11,85	42,2	15,9 *	10^{-7}
182	—	—	—	—	—	—	—	—	10^{-7}
208	—	—	—	—	—	—	—	—	10^{-7}
232	—	—	—	—	—	—	—	—	10^{-7}
258	—	—	—	—	—	—	—	—	10^{-7}

* Масляная кислота — 97 мг. Уксусная кислота — 31,05 мг.

Анализы показывают, что главное брожение длится 4—5 дней и достигает максимума на 2—3-й день брожения.

В первые дни брожения наблюдается увеличение летучих кислот, в дальнейшем, приблизительно через 5 суток от начала брожения, наблюдается незначительное падение их. В конце брожения количество масляной кислоты составляет 97 мг, а уксусной 31,06 мг. Количество нейтральных продуктов в процессе брожения возрастает. Так, например, количество ацетона достигает 5,96 мг, этанола 11,85 мг и бутилового спирта 42,2 мг. Весовые отношения ацетона к этанолу 1 : 2 (приблизительно на 1^{-3} г моля ацетона приходится $2{,}5^{-3}$ г моля этанола), а весовые отношения этанола к бутанолу 1 : 4, приблизительно на $2{,}5^{-3}$ г моля этанола приходится $0{,}5^{-3}$ г моля бутанола на один литр бражки. Количество альдегидов в процессе брожения падает и в конце брожения их остается 2,5 мг.

Наши опыты подтверждают, что прибавление глюкозы к МПБ благоприятствует образованию токсина, количество которого с течением времени продолжает возрастать. Снижение титра токсина наблюдается на 11—12-е сутки от начала брожения. Возрастание титра токсина в первое время идет за счет размножения и частичного отмирания клеток, а после брожения за счет отмирания и автолиза клеток с выделением токсина наружу. В дальнейшем под влиянием температуры термостата титр токсина начинает падать.

Исследование составных частей смеси газов, образовавшейся в процессе брожения

В мясопептонный бульон с 2% глюкозы в колбе емкостью 1,5 м производился обильный посев чистой культуры Bac. botulinus. Колба закрывалась каучуковой пробкой с вставленной в нее стеклянной трубкой для отвода газов. Полное удаление растворенного воздуха производилось посредством электрического вакуумного насоса. Примерно после 15 час. брожения (к тому времени вакуум в колбе уничтожался выделенными газами) колба соединялась с пипеткой Зегера и газы собирались над ртутью.

Анализ газов производился по методу Гемпеля. В ходе анализа сначала поглощаются летучие основания раствором H_2SO_4, затем погло-

Таблица 2

Состав газа, выделившийся при брожении

Среда	Продолжит. инкубации (в час.)	pH	CO_2 в %	H_2 в %	N_2 в %	Сумма в %	Отношение $CO_2 : H_2$
			Опыт 1				
МПБ с 2% глюкозы	30	7,02	52,14	35,50	3,80	91,44	1,44
	54	—	56,41	36,32	5,46	98,19	1,55
	78	—	63,43	28,80	7,33	99,56	2,20
	102	5,83	64,50	28,10	7,83	100,43	2,29
			Опыт 2				
МПБ с 2% глюкозы	30	7,02	51,25	35,80	4,50	91,55	1,45
	54	—	56,34	36,32	6,28	98,80	1,55
	78	—	63,16	28,50	7,63	99,19	2,21
	102	5,85	65,68	27,30	7,72	100,10	2,30

щается CO_2 раствором едкого кали, а к оставшемуся газу вводится достаточный избыток кислорода, и смесь взрывается электрической искрой для определения водорода. Избыток внесенного кислорода после взрыва поглощают щелочным раствором пирогаллола. Оставшийся газ представляет собой азот [2]. Результаты анализа приведены в табл. 2.

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что после 30 часов брожения сумма количеств углекислоты, водорода и азота дает преуменьшенную цифру 91,44 из требуемых 100. Это уменьшение связано с образованием аммиака и аминов, которые в первые дни брожения не могут быть связаны кислотами, так как последних очень мало. Это объяснение находит подтверждение в результатах последующих дней брожения, где сумма газов приближается к 100%. Следовательно, здесь имеет место накопление кислот, достаточное для связывания аммиака и аминов. Из продуктов белкового метаболизма были найдены сероводород, меркаптан и вышеупомянутые амины и аммиак.

Сероводород и меркаптан находятся в минимальных количествах, присутствие их может быть обнаружено только качественными реакциями. Присутствие меркаптанов легко определяется изатином, а сероводород — азотнокислым серебром. Интересно сопоставить количества образовавшегося водорода с количеством углекислоты в первые дни брожения. Высокое содержание водорода указывает на сахаролитическую деятельность этого микроба. После 30 часов инкубации отношение $\frac{CO}{H_2}$ составляет 1,44—1,45. В конце брожения это отношение увеличивается и достигает 2,29—2,3. Увеличение углекислоты на 4—5-й день брожения, по всей вероятности, происходит за счет декарбоксилирования аминокислот с выделением CO_2. Здесь преобладает гнилостное брожение, о чем свидетельствует глубокий распад белков с выделением свободного азота и накопление аммиака, аминов, а также присутствие сероводорода и меркаптанов.

Динамика распада белковых веществ

Для установления степени распада белковых веществ в культурах Bac. botulinus мы определяли общий и белковый азот по микро-кьельдалю, аммиак по Фолину и аминный азот по ван-Слайку.

Питательной средой для развития Bac. botulinus был взят МПБ (pH = 7,28) без глюкозы и МПБ с 2% глюкозы (pH = 7,15); последний — для установления влияния глюкозы на распад белковых веществ. Приготовление сред и заражение производились обычным способом, как уже приводилось выше.

По образованию мути в культурах можно было судить о том, достаточно ли хорошо развилась культура. Газ определялся через каждые 24 часа. Выделение газа в глюкозной среде достигало своего максимума через 40 час. после посева, выделение газа после 88 час. почти прекращалось. Количество газа, выделенного из МПБ с 2% глюкозы после 88 час. инкубации, было почти в 3 раза больше, чем при брожении в МПБ без глюкозы.

Пробы для исследования брались на 40-м часу после посева; это время достаточно для того, чтобы произошли основные химические изменения. Результаты анализов приведены в табл. 3.

---

[2] Оставшийся газ мы пропускали несколько раз через трубку с раскаленным металлическим магнием в порошке, который поглощает азот с образованием нитрита магния.

Таблица 3

Характеристика процесса распада белковых веществ в культуре Bac. botulinus. Данные на 100 мл бражки

Время	pH	Газ в мг	Общий азот в мг	Белковый азот в мг	Аминный азот в мг	Аммиачный азот в мг	Нелетучие кислоты в 0,1 *N* $Ba(OH)_2$
Мясопептонный бульон без глюкозы							
0	7,28	0	286,2	255,0	26,0	9,5	—
15 час.	7,28	20,0	—	—	—	—	—
40 „	7,25	45,0	281,6	170,4	50,7	29,6	3,8
64 „	7,20	53,0	—	—	—	—	—
88 „	7,20	75,0	278,6	123,9	69,5	42,5	7,2
112 „	7,25	85,0	278,6	108,1	63,6	60,5	15,9
10 дн.	7,25	95,0	279,6	83,2	72,6	73,2	18,3
Мясопептонный бульон с 2% глюкозы							
0	7,15	0	299,6	232,8	28,0	9,5	—
15 час.	7,08	50	—	—	—	—	—
40 „	6,65	155	297,2	193,9	54,4	15,8	2,5
64 „	5,94	190	—	—	—	—	—
88 „	5,90	205	295,7	160,3	74,8	21,8	4,8
112 „	5,85	205	296,5	153,6	77,5	25,4	7,8
10 дн.	5,78	205	296,0	139,7	86,8	29,5	9,25

Как видно из табл. 3, начальное значение pH в МПБ без глюкозы в процессе брожения мало изменялось, в то время как в МПБ с 2% глюкозы pH сильно снижалось, доходя к концу брожения до 5,78, что свидетельствует о быстром распаде углеводов с образованием летучих кислот и углекислоты.

В среде МПБ с глюкозой брожение протекает быстрее и заканчивается через трое суток, в то время как в среде МПБ без глюкозы оно протекает медленнее и заканчивается только на 7—8-е сутки.

Кислоты, образовавшиеся при брожении глюкозы, подавляют жизнедеятельность Bac. botulinus. Реакция среды на 64-м часу была pH = = 5,94; при такой активной кислотности Bac. botulinus почти прекращает развитие.

Анализы на 40-м часу свидетельствуют о значительном распаде белкового азота до аминокислот и аммиака. Часть аммиака выделяется в виде газа и поэтому общий азот уменьшается. В пробе, взятой после 112 час., имело место уменьшение аминокислот, резкое возрастание свободного аммиака и значительное увеличение нелетучих кислот; повидимому, это вызвано дезаминированием аминокислот.

После 10-дневного брожения наблюдалось снова возрастание количества аминокислот. К этому времени почти 75% белкового азота подвергалось гидролизу до аминокислот и аммиака. Присутствие глюкозы благоприятствует накоплению аминокислот. Следовательно, в этом случае аминокислоты не подвергаются в такой степени дезаминированию, как в МПБ без глюкозы.

Образовавшиеся летучие кислоты в процессе распада углеводов быстро снижают pH среды и задерживают развитие культуры, а поэтому в глюкозной среде идет более медленное накопление летучих кислот, образующихся при дезаминировании. В белковой среде без глюкозы Bac. botulinus сильнее разлагают белки до аминокислот, причем амино-

кислоты более энергично дезаминируются, что проявляется в виде усиленного образования аммиака.

В заключение считаю приятным долгом принести глубокую благодарность моему руководителю проф. Ф. М. Чистякову, под руководством которого была выполнена эта работа.

Выводы

1. Нами изучалось брожение Bac. botulinus на МПБ с 2% глюкозы. В процессе брожения определялись летучие кислоты, pH и Eh среды, альдегиды, ацетон, этанол, бутанол, а также производились биологические пробы на присутствие токсина.

2. Выяснилось, что в первые дни брожения идет повышение летучих кислот, а в дальнейшем наблюдается незначительное падение их. Количество нейтральных продуктов (ацетон, этанол и бутанол) возрастает в течение всего периода брожения. Наоборот, количество альдегидов в процессе брожения уменьшается.

3. Летучие кислоты, образовавшиеся в 5-дневной культуре на МПБ с 2% глюкозы, были идентифицированы как уксусная и масляная в отношении 1 : 2.

4. При анализе газов, выделенных в процессе брожения, обнаруживаются углекислота и водород в соотношении 1,4 : 1 — 2,3 : 1, небольшое количество азота и очень незначительное количество сероводорода и меркаптанов.

5. Bac. botulinus на МПБ без глюкозы вызывает слабое выделение углекислоты и значительное накопление аммиака в результате дезаминирования аминокислот, при очень незначительном изменении реакции среды.

Добавление глюкозы усиливает бродильную деятельность Bac. botulinus, о чем свидетельствует большое количество выделяющегося газа, накопление летучих кислот и понижение pH среды.

Всесоюзный научно-исследовательский институт холодильной промышленности им. А. И. Микояна
Москва

Получено 19. IX. 1949 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейер К. Ф. Ботулизм. Перевод с немецкого, под редакцией проф. Я. Я. Никитинского.
2. Anderson B. G. Gaseous metabolism of some anaerobic bacteria. J. Inf. Dis., 35, 219, 1924.
3. Wagner E., Meyer K. F. and Dozier C. C. Studies on the metabolism of Botulinus in various media. J. Bact., 10, 321, 1925.
4. Kline L. Der Nachweis und Bestimmung der flüchtigen Fettsäure. Bioch. Z., 273, 9, 1934.

СЕМЯДОЛЬНЫЙ БАКТЕРИОЗ СОИ И БОРЬБА С НИМ

А. П. Клыков

Бактериоз всходов сои отмечен во многих районах ее возделывания [3, 4]. В некоторых случаях поражение всходов достигает таких размеров, что возникает необходимость пересева. Вред от семядольного бактериоза выражается в виде потери всхожести у семян, гибели проростков и замедлении развития растений. Этими ограниченными сведениями исчерпываются все литературные данные.

В течение 1948—1949 гг. нами проведены некоторые исследования по этому виду заболевания, результаты которых изложены в настоящей статье.

Симптомы заболевания

Просмотр многочисленных сортов семян сои показал, что чаще всего признаки поражения сводятся к наличию беловатых вдавленных пятен различной величины. В массе пораженные семена отличаются от здоровых белесоватым оттенком и потерей блеска. В некоторых случаях обнаруживаются заметные на-глаз трещины.

Для проверки семена с указанными признаками заболевания высевались в стерильную почву. Контролем служили тщательно отобранные внешне здоровые семена. Результаты приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика всходов, полученных от внешне здоровых и больных семян

Семена	Почва	Сорт сои	Не взошедших	Из взошедших	
				больных	здоровых
С признаком заболевания	Стерильная	ВНИИМК 9186*	30	44	26
		Ново-Кубанская 52	16	61	23
		Кубанская 276	17	39	44
		Кубанская 4958	6	58	36
		Харбинская 231-а	13	68	19
		Среднее	16,6	54,0	29,4
Внешне здоровые	»	ВНИИМК 9186	4	7	89
		Ново-Кубанская 52	7	4	89
		Кубанская 276	6	6	88
		Кубанская 4958	0	2	98
		Харбинская 231-а	3	8	89
		Среднее	4,0	5,4	90,6

* Наименование сорта сои, выведенного Всесоюзным научно-исследовательским институтом масличных культур (ВНИИМК).

Приведенная таблица показывает правильность признака отбора пораженных бактериозом семян, которые на 70% были невсхожими или дали больные всходы. Одновременно эти данные показывают, что и внешне здоровые семена могут давать больные всходы. Следовательно, отбор хотя и резко снижает количество больных растений, но не освобождает полностью посев от бактериоза.

При набухании семядоли частично или полностью превращаются в слизистую массу, не давая ростка. В некоторых случаях ростки появляются, но ослизняются, буреют и погибают. Такое явление наблюдается в значительном количестве и у некоторых сортов доходит до 50%.

На семядолях, вышедших на поверхность земли, отмечены следующие симптомы: 1) пятна различной величины и формы, бурые и темно-бурые, вдавленные, поверхностные или сквозные; 2) на плоской стороне семядолей маслянистые, поверхностные, постепенно буреющие пятна; 3) по краям семядолей каймой проходит почернение ткани, которая впоследствии отмирает. Роста грибницы не наблюдалось.

На подсемядольном колене образуются буро-коричневые, широкие, продолговатые, вдавленные пятна (полосы). Иногда пятна распространяются вокруг подсемядольного колена или прикорневой части, образуя перетяжку. Часто они захватывают и стебель между семядолями и настоящими листьями.

При сильном поражении всходы погибают, а при слабом образуются трехлопастные листья без признаков заболевания, и при дальнейшем развитии никаких симптомов не обнаруживается, кроме отставания в росте.

Возбудители заболевания

При посеве семян и больных семядолей на МПА систематически встречались два вида бактерий: Bacterium solanacearum Smith и Bacterium sojae Wolf. Первая из них, по литературным данным [6], может вызвать увядание сои, а вторая — бурую угловатую пятнистость.

Идентификация бактерий проводилась по общепринятой методике, основанной на изучении морфологических и культурально-биохимических признаков. При отборе колоний для определения использовался капельный метод агглютинации, который значительно ускорял работу. Сопоставление признаков сделано по описаниям, изложенным в определителях Бердже [1], Цион [5] и книгах Ячевского [6] и Бургвица [2]. Морфобиохимическая характеристика возбудителей семядольного бактериоза изложена в табл. 2.

Необходимо отметить, что штаммы 20 и 37 могут быть идентифицированы и как Bacterium medicaginis var. phaseolicola, признаки которой почти ничем не отличаются от Bacterium sojae Wolf.

Из семян и семядолей Bacterium solanacearum выделена 12 раз, а Bacterium sojae — 13; на створках бобов — соответственно 15 раз и 3 раза.

Возможности передачи заболевания через семена и почву

Если наличие бактерий в семенах не вызывает сомнения, то практически важно установить, с поверхностной или глубокой инфекцией приходится иметь дело. Поверхностная обработка различными влажными дезинфекторами показала, что после обработки на поверхности семян бактерии отсутствуют, но при посеве семян в стерильную почву всходы бывают поражены в значительном количестве.

С целью выявления локализации бактерий нами был проведен дифференцированный анализ семян. Методика была следующей.

Семена, взятые непосредственно из бобов, дезинфицировались спиртом и помещались в стерильную воду на два-три часа. У набухших

Морфобиохимическая характеристика бактерий, выделенных из сои

Вид бактерий	Движение	Окраска по Граму	Споры	Капсулы	МПБ: пленка	МПБ: муть	Колонии на агаре	Желатина уколом	Молоко: свертывание	Молоко: пептонизация	Молоко с лакмусом	Рост на картофеле	Углеводы: глюкоза	Углеводы: лактоза	Углеводы: сахароза	Углеводы: мальтоза	Углеводы: маннит	Углеводы: декстроза	Крахмал	Нитраты	Индол	Аммиак	Сероводород
Bacterium solanacearum	+	—	—	—	+	+	Белые или темные	—	—	+	Подщелачивается	Белый, затем коричневый	—	—	—	—	—	—	∓	+	—	+	
Штамм 14 из семян	+	—	—	—		+	Белые, затем темнеющие	—	—	+	Синеет	Белый	—	—	—	—	—		—	+	—	+	—
Bacterium sojae	+	—	—	±		+	Белые	—	—		„	Сероватый	—	—	∓		—	∓	∓	—	—		
Штамм 20 из семян	+	—	—		—	+	Кремово-белые	—		±	„	Серый	±	—	—	—	—		—	—	—	—	—
Штамм 37 из семян	+	—	—		±	+	Белые, затем кремовые	—	—	—	„	„	±	—	—	—	—		—	—	—	—	—

семян оболочка и зародыш легко отделялись от семядолей. Отпрепарированные части снова дезинфицировались и промывались, а затем измельчались в стерильной ступке. Полученная суспензия в количестве двух капель наносилась на чашки Петри с МПА и растиралась по поверхности стерильным шпателем Дригальского. На третий день выросшие колонии подсчитывались. Количество их приводится в баллах со следующим значением: 0 — колоний нет, 01 — до 10 штук, 1 — до 100, 2 — до 500, 3 — до 1000, 4 — свыше 1000, 4с — сплошной рост, не поддающийся подсчету. В табл. 3 приводятся результаты.

Таблица 3

Локализация бактерий в различных частях семян

Сорт	Наличие бактерий (в баллах)		
	оболочки	зародыши	семядоли
Ново-Кубанская 52	4с	4с	4с
ВНИИМК 9186	4с	4с	4с
Харбинская 231-а	4	0,1	1
Харбинская 231-е	4с	4с	3
Кубанская 276	4с	4с	4с
Кубанская 4958	4с	4с	4с
Куйбышевская 77	4	2	4
Рекорд Северный	4	3	4
Амурская 41	4с	3	4
Крушуль 9/3	4	2	2

Данные анализов вполне убедительно говорят в пользу глубокой инфекции.

Однако для доказательства возможности передачи заболевания семенами требуются результаты прямых опытов, цель которых сводится к выращиванию больных растений из зараженных семян при устранении других причин инфекции.

С этой целью мы высевали в сосуды со стерильной и нестерильной почвой по 100 семян 5 сортов сои с внешними признаками поражения и без таковых.

Результаты приводятся в табл. 4.

Таблица 4

Возможность передачи заболевания через семена

(Количество больных растений на 100 семян)

Сорт	ВНИИМК 9186		Н.-Кубан. 52		Кубан. 276		Кубан. 4958		Харбин. 231-а		Среднее по вариантам	
Почва / Семена	Стерильная	Нестерильная	Стерильная	Нестерильная	Стерильная	Нестерильная	Стерильная	Нестерильная	Стерильная	Нестерильная	Стерильная	Нестерильная
Больные по внешним признакам	44	26	61	64	39	43	58	52	68	61	54	49,2
Здоровые по внешним признакам	7	8	7	40	6	8	0	4	8	18	5,6	15,6

Из этого опыта можно сделать два заключения: 1) получение больных всходов на стерильной почве можно объяснить лишь передачей заболевания семенами; 2) зараженные по внешним признакам семена дают значительно больший процент больных растений по сравнению с внешне здоровыми.

Таблица 5

Влияние почвы на количество больных всходов

Почва	Больные всходы в процентах	
	обычные семена	протравленные гранозаном
Стерильная	5	0
Нестерильная	24	6
Стерильная зараженная . . .	34	28
Нестерильная зараженная	50	14

Вопрос передачи семядольного бактериоза сои через почву в литературе не затрагивался, но возможность этого не исключена, так как сохраняемость в почве одного из возбудителей его — Bacterium solanacearum доказана.

В процессе работы нами неоднократно наблюдалось увеличение процента больных всходов на нестерильной почве, что заставило заложить специальный опыт, который мог бы создать уверенность в возможности почвенной инфекции. Посев проводился выровненными семенами сорта Ново-Кубанская 52, по 100 штук в каждый сосуд. Почва заражалась смесью бактерий, выросших на МПА из семян и больных семядольных листьев. В табл. 5 приведены результаты опыта.

Опыт оказался очень показательным. Больные всходы отсутствовали только в одном варианте — семена, протравленные гранозаном и выращенные в стерильной почве. Однако этот вариант для производства неприемлем в силу большой трудоемкости и невозможности стерилизации почвы в полевых условиях. Вполне приемлемым является вариант с такими же семенами в нестерильной почве. Заслуживают внимания данные искусственного заражения почвы, где получился значительно больший процент заболевших растений.

Борьба с бактериозом всходов

Установление факта глубокой семенной инфекции позволило перейти к подбору и широкому испытанию протравителя семян. Разрешение этого вопроса встретило большие затруднения в силу следующих причин:

1. Любое, хотя бы и кратковременное, намачивание семян сои приводит к массовому отделению оболочки от семядолей, в результате чего резко снижается всхожесть. Последующая просушка мало исправляет положение. Таким образом, применение любого влажного протравливания практически полностью исключается.

2. Наличие глубокой инфекции делает безрезультатным поверхностное обеззараживание семян.

3. Сухое прогревание возможно только при температуре до 60° в течение 4 часов. При повышении температур или увеличении экспози-

ции всхожесть резко снижается, а процент больных растений уменьшается незначительно.

В данном случае требуется препарат, дезинфицирующая способность которого продолжалась бы в течение всего периода прорастания семян без отрицательного влияния на всхожесть и развитие. Этому требованию, на наш взгляд, удовлетворял ртутный препарат, изготовленный Институтом удобрений и инсектофунгисидов,— гранозан. Лабораторные исследования полностью подтвердили предположение. Результаты испытаний изложены в табл. 6.

Таблица 6

Влияние гранозана на проявление бактериоза всходов

Семена	Сорт	Всходы из 100	Из взошедших		Не взошло
			здоровых	больных	
Обработанные гранозаном	ВНИИМК 9186	99	90	9	1
То же	Ново-Кубанская 52	99	93	6	1
»	Харбинская 231-а	99	88	3	9
	Кубанская 276	97	91	6	3
	Кубанская 4958	96	96	0	4
	Среднее . . .	98,0	91,6	4,8	3,6
Контроль	ВНИИМК 9186	60	19	41	40
»	Ново-Кубанская 52	65	15	50	35
»	Харбинская 231-а	73	38	35	27
»	Кубанская 276	85	52	33	15
»	Кубанская 4958	97	82	15	3
	Среднее . . .	76,0	41,2	34,8	24,0

Таблица 7

Влияние гранозана на урожай сои

Сорт	Посев семенами урожая	Вариант опыта	Посев	Урожай с га	
				в кг	в % к контролю
ВНИИМК 9186	1948	Гранозан	Деляночный	1410	120
То же	1948	Контроль	»	1172	100
»	1947	Гранозан 5:1000	»	1540	121,5
»	1947	» 3:1000	»	1395	109,4
»	1947	Контроль	»	1275	100
»	1948	Гранозан 5:1000	Производственный	2452	129
»	1948	Контроль	»	1902	100
Ново-Кубанская 52	1948	Гранозан	Деляночный	1474	110
То же	1948	Контроль	»	1340	100
»	1947	Гранозан 5:1000	»	1172	138,6
»	1947	» 3:1000	»	940	111
»	1947	Контроль	»	845	100

О достоинствах гранозана как протравителя говорит почти полное освобождение от бактериоза всходов и увеличение процента всхожести семян.

Положительный результат многократных лабораторных опытов позволил перейти на широкое испытание гранозана в полевых условиях.

Протравливание проводилось за 2—4 дня до посева общепринятым сухим способом в дозировке 5 кг порошка на тонну семян.

Наблюдения и учеты показали, что на полевых посевах, протравленных гранозаном, увеличивалась всхожесть, резко снижался бактериоз семядолей и развитие первых фаз протекало значительно лучше, чем в контроле. Урожайные данные приводятся в табл. 7.

Из таблицы видно, что во всех случаях, с посевов, обработанных гранозаном, урожай был значительно выше по сравнению с контролями.

Для проверки действия гранозана на развитие клубеньков в начале августа нами были взяты пробы с трех участков производственного посева. Каждая проба состояла из 30 растений, взятых в 10 местах. Подсчет количества клубеньков дал следующие результаты (табл. 8).

Таблица 8

Влияние гранозана на развитие клубеньков

Посев сои	Общее количество клубеньков	На 1 растение	
		среднее	максим.
Протравленный, ВНИИМК 9186 .	369	12,3	154
Контроль, ВНИИМК 9186	145	4,8	37
Контроль, Харбинская 231-а . .	111	3,7	12

Следовательно, протравливание гранозаном не влияет отрицательно на образование клубеньков, а, наоборот, увеличивает их количество. Дальнейшие периодические наблюдения неизменно подтверждали приведенные показатели.

Выводы

1. Из семян сои и больных семядольным бактериозом всходов систематически выделялись 2 вида бактерий: Bacterium solanacearum Smith и Bacterium sojae Wolf. Патогенность их доказана экспериментальным путем.

2. Многочисленные опыты с полной убедительностью говорят о наличии глубокой семеннной инфекции, причем бактерии могут локализироваться в оболочке, семядолях и зародыше.

3. Передача заболевания семенами не вызывает сомнения. Внешние признаки больных семян выражены в виде различной величины вдавленности, белесоватости, потери блеска, а иногда растрескивания оболочки. Отбор семян по этим признакам резко снижает процент пораженных всходов, но не освобождает полностью от заболевания.

4. Систематическое увеличение больных всходов в нестерильной или искусственно зараженной почве говорит о вероятности почвенной инфекции. Возможно, что здесь имеет место усиление проявления семенной инфекции.

5. Широкое испытание протравливания семян гранозаном сухим способом в дозировке 5 кг на тонну показало его высокую эффективность, которая выражена в следующих показателях: а) увеличивается

процент всхожести; б) ускоряется появление всходов и наблюдается большая выравненность их; в) резко снижается количество больных семядольных бактериозом растений; г) увеличивается урожай сои.

Это мероприятие может быть рекомендовано как прием, повышающий урожай сои.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт сои и клещевины
Краснодарский край

Получено 19.IX.1949 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берджe Д. Определитель микробов. АН УССР, 1936.
2. Бургвиц Г. К. Бактериальные болезни растений. АН СССР, 1936.
3. Заянчковская М. С. Болезни сои на Украине. Тр. Всесоюзного института северного зернового хозяйства и зернобобовых культур, вып. III, 1938.
4. Катаева О. Е. Болезни сои. Сводный отчет Горской зональной опытной станции за 1931 г., вып. IV, 1932.
5. Цион Р. А. Определитель микробов. ОГИЗ, 1948.
6. Ячевский А. А Бактериозы растений. ОГИЗ, 1935.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО НЕКРОЗА ЦИТРУСОВЫХ

Ю. И. Шнейдер

Цитрусовые насаждения — лимоны, апельсины, мандарины, цитроны и другие — являются важными сельскохозяйственными культурами южных областей Советского Союза. Исключительно большое внимание уделяется цитрусовым культурам в третьей Сталинской пятилетке. Значительно расширяются площади этих насаждений в основных районах их выращивания. Успехи передовой мичуринской агробиологической науки дали возможность начать смелое и энергичное продвижение этих ценных субтропических культур далеко на север от мест прежнего их произрастания.

Важное значение приобретает создание и воспитание ряда новых сортов цитрусовых культур, пригодных для выращивания в новых районах их культивирования и разработка агротехники их возделывания. Не меньшее значение приобретает также изучение ряда вредоносных заболеваний этих культур, предохранение завоза с посадочным материалом возбудителей болезней из старых районов выращивания в новые и разработка эффективных мер борьбы с основными болезнями цитрусовых культур.

Лаборатория бактериозов Московской станции Всесоюзного института защиты растений в течение 1948—1949 гг. проводила работы по выявлению состава бактериальных заболеваний субтропических культур и детальному изучению основных из них. Обследования, проведенные в ряде районов субтропической зоны Грузинской ССР, показали, что из бактериальных заболеваний главное значение имеет бактериальный некроз цитрусовых культур. Изучению этого заболевания было уделено основное внимание.

Симптомы и течение болезни

Бактериальный некроз цитрусовых был обнаружен в 1910 г. в южной Калифорнии в виде черной пятнистости плодов. Тогда же выделен возбудитель болезни, названный Bacterium citriputeale C. O. Smith. Вскоре было доказано, что эта бактерия вызывает характерные заболевания ветвей и листьев цитрусовых, и это, следовательно, две формы одного и того же заболевания. Данная болезнь обнаружена в ряде государств Средиземноморского побережья Европы и Африки, а также в Австралии. В СССР она была найдена в 1932 году [6]. Болезнь изучалась до последнего времени недостаточно. Имеются только серологические исследования, проведенные Израильским и Степуниной [3, 4]. Слабо изучена специализация возбудителя некроза, биологические особенности его развития, вопрос о сохранении бактерии в естественных условиях, а также условия, благоприятствующие возникновению и распространению данного заболевания. В связи с этим недостаточно разработаны были меры борьбы с бактериальным некрозом.

Бактериальный некроз цитрусовых проявляется в условиях Аджарии ранней весной, перед началом вегетации цитрусовых деревьев. При наличии благоприятной погоды болезнь в короткое время охватывает довольно значительные участки цитрусовых насаждений, в основном находящихся на открытых, не защищенных от действия ветров, склонах.

Очаговость — характерный признак заболевания цитрусовых насаждений бактериальным некрозом. Почти все виды цитрусовых деревьев, в том числе многие гибридные формы, восприимчивы к данной болезни.

Болезнь поражает стебли, листья, черешки и плоды. На деревьях болезнь начинается в местах повреждения растений, через которые возбудитель проникает внутрь дерева. На стебле, в местах повреждений

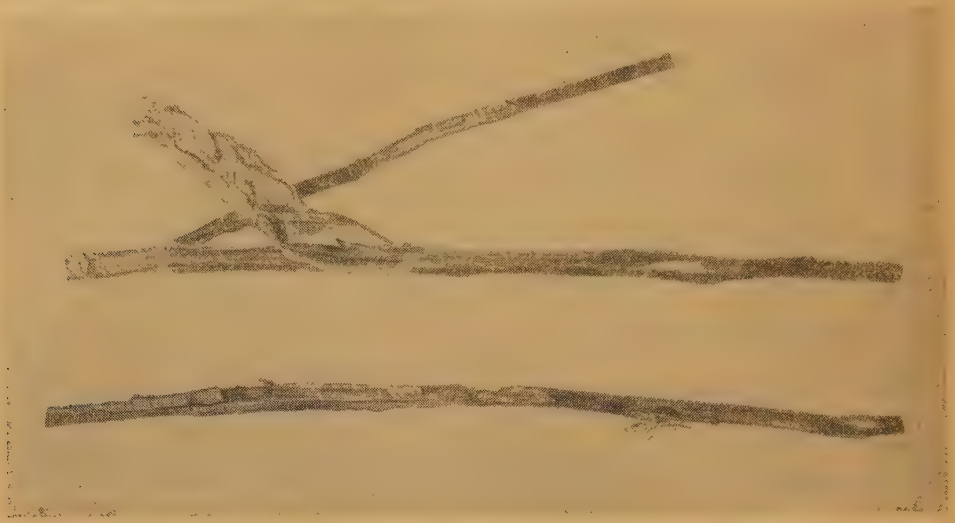


Рис. 1. Пораженные бактериальным некрозом ветви мандарина

образуются вначале водянистые пятна 1—2 мм в диаметре, которые увеличиваются затем в размерах, чернеют и буреют. Часто инфекция начинается на стебле вокруг черешка. Заболевшая часть стебля темнеет, а затем покрывается красновато-коричневой коркой отмерших частей стебля. Засохшие ветки имеют красновато-коричневую окраску.

Черешок листа при заболевании размягчается и чернеет, болезнь обычно переходит на листовую пластинку. Возбудитель передвигается вначале по жилкам пластинки, которая заболевает, начиная от основания, и вскоре отмирает. Отмершие листья могут некоторое время висеть на ветках, но потом, под действием ветра, происходит их массовое опадание. Было отмечено, что возбудитель распространяется в одном направлении от места внесения инфекции. Так, при искусственном заражении лимонов в естественных условиях, при внесении возбудителя непосредственно в сосуды листовой пластинки, черешок оставался здоровым, при сильном заболевании пластинки листа. При внесении возбудителя в черешок происходило его заболевание, которое передавалось на пластинку, но стебель при этом оставался совершенно здоровым.

Активное течение болезни в описанной выше форме длится примерно один месяц. В менее активной форме болезнь продолжает развиваться еще до двух месяцев, вызывая увеличение и разрастание некротических очагов и полное усыхание ветвей, на которых поселяются различные сапрофитные грибы.

Таким образом, бактериальный некроз вызывает сильное заболевание листьев дерева и их массовое опадение, усыхание ветвей прошлогоднего прироста и, при особо сильных формах болезни, может привести к гибели всего дерева (часто такие деревья бывают предварительно ослаблены какими-либо внешними неблагоприятными факторами).

Мандариновые деревья заболевают не в меньшей степени, чем лимонные. Симптомы заболевания напоминают таковые у лимонных де-

ревьев (см. рис. 1). Отсутствие колючек у мандариновых деревьев не является препятствием для возникновения и распространения бактериального некроза. Такие факторы, как ветер, дождь, колебания температуры, вызывают повреждение и растрескивание стеблей, черешков и листовых пластинок и создают необходимые условия для внедрения инфекции в здоровое растение.

Возбудитель бактериального некроза цитрусовых вызывает также заболевание плодов, образуя на них пятна различной величины (рис. 2).

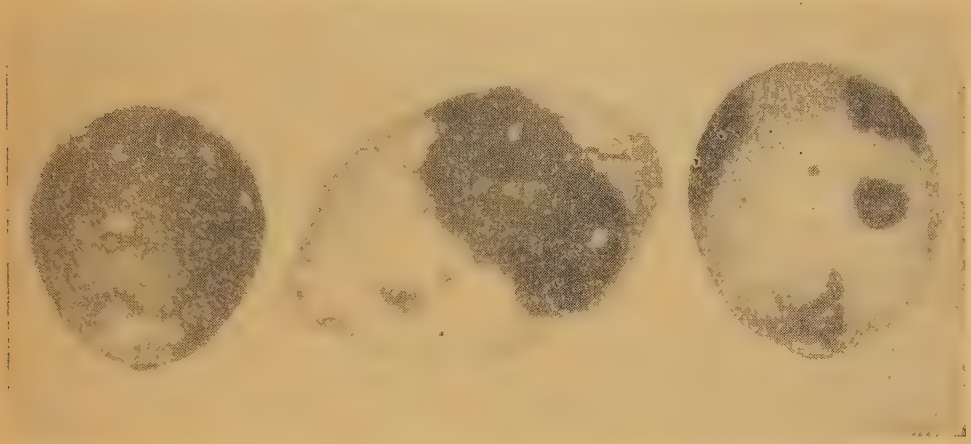


Рис. 2. Различные степени поражения плодов лимона (искусственное заражение)

Вначале на плодах образуются округлые, водянистые, слегка вдавленные пятна 2—3 мм в диаметре. Пятна затем увеличиваются в размерах и достигают 10—15 мм в диаметре. Затем они углубляются и приобретают на плодах лимона темнокоричневую окраску. На плодах апельсина и мандарина пятна более светлые и в меньшей степени вдавлены. В одних случаях пятна остаются локальными, в других — болезнь сильно прогрессирует и приводит к полному покоричневению кожицы плода. Болезнь поражает только кожицу, не проникая в глубь плода. Пятнистость причиняет плодам цитрусовых двоякий вред: во-первых, плоды теряют свою товарную ценность, во-вторых,— и это главное — они не выдерживают длительного хранения. Язвы на плодах способствуют проникновению в глубь их различных микроорганизмов (Penicillium, Botrytis и др.), вызывающих впоследствии полное разрушение плода.

Вредоносность бактериального некроза

Как видно из краткого описания симптомов заболевания, бактериальный некроз поражает такие существенные части растения, как листья, побеги, плоды. Потеря листьев и побегов прошлого года отрицательно сказывается на всей жизнедеятельности цитрусовых деревьев и, что особо важно, на урожае плодов.

По данным Александрова, листья лимонов прошлого года «определяют урожайность и энергию роста побегов текущего года. Они физиологически активны с весны и обеспечивают питанием все дерево» [1]. Поскольку некроз вызывает заболевание именно этих листьев, ясно, что массовое весеннее опадание их перед началом активной вегетации приносит лимонному дереву большой вред. Это ослабляет его и должно сильно снизить урожайность дерева в текущем году.

Весной 1949 г. нами был поставлен опыт по определению вредоносности бактериального некроза для мандариновых деревьев. Отметим, что

весной этого года наблюдалась не очень сильная вспышка этого заболевания. В опыте учитывались количество появившихся молодых побегов и их средний прирост на больных и здоровых ветках, а также относительное количество листьев и плодов на тех же ветках. Эти данные показаны в табл. 1.

Таблица 1

Вредоносность бактериального некроза цитрусовых

Элементы учета	На здоровой ветке	На больной ветке
Среднее количество появившихся побегов	10,7	6,6
Средний прирост побегов (в см)	9,6	8,3
Среднее количество появившихся молодых листьев	65,1	43,6

Из табл. 1 следует, что количество листьев на больных ветках на 33% меньше, чем на здоровых, среднее количество появившихся молодых побегов было на 38,3% больше на здоровых ветках, а средний прирост побегов соответственно на 13,5% больше. Количество образовавшихся плодов было на здоровых ветках в 3 раза больше, чем на больных; 10% веток совершенно не дали прироста и вскоре засохли. Если учесть, что в годы сильных вспышек некроза процент пораженных побегов на больном дереве достигает 50, то станет ясно, что эта болезнь является очень вредной и для мандариновых деревьев.

Большой вред Bact. citriputeale приносит также плодам цитрусовых, о чем уже упоминалось выше. Для организации успешных мероприятий по борьбе с бактериальным некрозом необходимо было прежде всего детально изучить биологические особенности возбудителя болезни и те специфические условия, при которых он может вызывать вспышку болезни.

Биологические особенности Bacterium citriputeale

а) Получение чистых культур и испытание их патогенности. Бактериальный некроз цитрусовых вызывается неспороносной бактерией Bacterium citriputeale C. O. Smith. Для ее изучения была получена чистая культура этой бактерии. Материал для выделения — ветки, листья и плоды — собирался в местах сильных вспышек некроза. В течение двух лет было выделено большое количество культур бактерий с разных видов цитрусовых деревьев. Выделенные культуры испытывались прежде всего на патогенность (на сеянцах лимонов и апельсинов, а также на плодах). Все непатогенные культуры отбрасывались. Для испытания патогенности горшковые культуры лимонов и апельсинов заражались в условиях высокой относительной влажности воздуха выделенными бактериями. Наблюдения и опыты показали, что высокая относительная влажность воздуха и даже наличие капельно-жидкой воды являются необходимым условием для возникновения некроза. Заражение производилось водной суспензией чистой культуры, вносимой с помощью стерильной игры в черешок листа и стебель. На 2—3-й день патогенные культуры вызывали появление на стебле и черешке небольших водянистых пятен, которые разрастались и принимали темный цвет. Болезнь с черешка переходила на пластинку листа,

вызывала его отмирание и характерное загибание. Впоследствии листья опадали. Верхушка сеянца часто совершенно темнела и погибала (рис. 3). Характер и симптомы заболевания, вызываемые в искусственных условиях различными культурами, были сходны, хотя степень поражения сильно варьировала.

Рис. 3. Пораженные ветви апельсина (искусственное заражение)

Было найдено до 15 патогенных культур с основных видов цитрусовых деревьев: лимона, мандарина, апельсина, кинкана, горького апельсина, а также с тунга, которые отличались между собой большей или меньшей степенью вирулентности. Выделенные культуры Bact. citriputeale при росте на картофельном агаре образуют голубоватые, полупрозрачные, блестящие, небольшие колонии со слабо изрезанными краями.

По своим биохимическим свойствам выделенные культуры оказались вполне сходными и должны быть отнесены к Bact. citriputeale. Все они вызывали разжижение желатины, нитраты не редуцировали, вызывали пептонизацию молока и слабое посинение в лакмусовом молоке, крахмал не гидролизуют, на средах с сахарами не образуют газа, на глюкозе, сахарозе и галактозе образуют кислоту, индол не образуют.

б) Изучение влияния температуры на рост колоний бактерий. Изучение воздействия температуры на рост колоний Bact. citriputeale, проведенное в политермостате, показало, что рост и жизнедеятельность бактерий возможны в широких пределах, от температуры, близкой к нулю, до 30° и выше, причем температурный оптимум для роста бактерий лежит в пределах от 15° до 25° [1] (рис. 4). На рис. 4 приведена кривая роста четырех культур бактерий в зависимости от изменения температуры. Цифры в графике указывают номера культур.

[1] Указанный в «Справочнике агронома по защите растений» [5] оптимум для развития Bact. citriputeale не совпадает с нашими данными, возможно, потому, что автор пользовался данными, взятыми из заграничных работ.

Из рисунка видно, что повышение температуры усиливало рост колоний бактерий, но, начиная с некоторого минимума (около 10°), рост колоний усиливался незначительно. Температура выше 25° вызывала задержку роста всех испытываемых культур. Следует отметить хороший рост колоний, при довольно низкой температуре (4°), сильно патогенной культуры № 3.

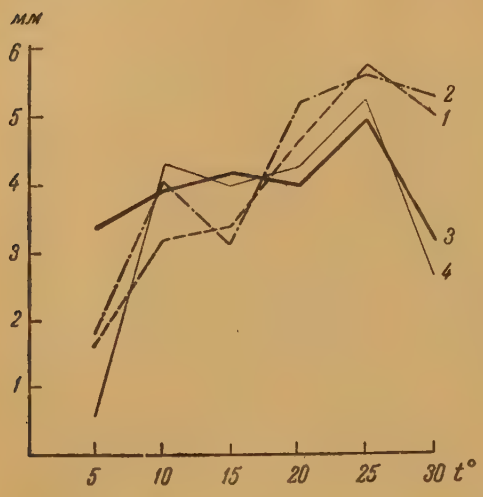


Рис. 4. Влияние температуры на рост колонии

Эти исследования показали способность Bact. citriputeale к жизнедеятельности при сравнительно низкой температуре. Если при этом учесть, что после перенесения зимних холодов с дождями, снегом и ветрами цитрусовые деревья обычно бывают ослабленными и потому более восприимчивыми к заболеванию, станет ясным, почему вспышки бактериального некроза происходят, главным образом, весной (март—май).

Изучалось также влияние температуры на развитие пятнистости плодов мандарина при искусственном заражении культурой № 3 в политермостате. Размеры пятен измерялись через 3 и 5 дней. Эти данные показаны в табл. 2.

Таблица 2

Влияние температуры на заболевание плодов мандаринов некрозом

Температура в камере . .	3,5	12,7	17	21,5	27	30
Диаметр пятна через 3 дня в мм	—	2,7	3,7	4	6,08	—
Диаметр пятна через 5 дней в мм	—	3,25	6,35	8,08	11,0	—

Из этой таблицы следует, что в нашем опыте Bact. citriputeale вызывал образование пятен на плодах мандарина лишь начиная с температуры 10°. Оптимальная температура для развития пятнистости была около 25°, а при температуре 30° развитие пятнистости не наблюдалось. Опыт показал, что для возникновения и развития пятнистости плодов требуются более определенные температурные условия, чем для роста бактерий. Критические температуры (ниже 10° и выше 30°) — для развития пятнистости плодов не являются таковыми для роста и жизнедеятельности самой бактерии.

в) Опыты с высушиванием Bact. citriputeale. Интересные данные, показывающие высокую приспособленность бактерий к выживанию в неблагоприятных внешних условиях среды, получены в

опытах с высушиванием Bact. citriputeale. Все испытанные штаммы сохраняли свою жизнеспособность после высушивания при 20° до 5 суток.

г) Рост колоний при различной pH среды. Изучение роста колоний на мясопептонном агаре при различной pH среды дало следующие результаты: при pH среды ниже 6 бактерия расти не может; оптимальные условия pH среды находятся в пределах, близких к нейтральной реакции (от pH = 6,5—7,5). Дальнейшее повышение щелочности среды начинает тормозить рост Bact. citriputeale. Данный опыт объясняет — почему при развитии пятнистости на плодах цитрусовых, возбудитель не проникает за пределы кожицы внутрь плода, где pH, по всей вероятности, ниже 6.

Все вышеприведенные исследования говорят о том, что Baci. citriputeale может сохраняться и расти при довольно широких колебаниях факторов внешней среды.

Сохраняемость Bact. citriputeale в природе

Развитие бактериального некроза цитрусовых в естественных условиях в виде массовых вспышек с активным течением болезни охватывает приблизительно 1—2 месяца (март-май, иногда начало июня как это имело место в 1949 г.). Затем болезнь проявляется некоторое время в менее активной форме, когда происходит медленное увеличение некротических очагов на заболевших ветвях и отмирание веток. Остальное время возбудитель находится в скрытом состоянии, и в летний период (июль-сентябрь) болезнь в природе не встречается. Каким образом происходит сохранение Bact. citriputeale в этот период? Этот вопрос имеет большой теоретический и главное практический интерес.

Можно было предположить прежде всего, что бактерии в течение длительного периода в небольших количествах могут сохраняться в больных ветвях и листьях. Важно было также выяснить, может ли Bact. citriputeale длительное время сохраняться в остатках больных растений, в срезанных ветвях и опавших листьях. Не было известно, как долго может сохраняться возбудитель некроза в почве. И, наконец, можно было предположить о существовании какого-либо другого растения, с которого возбудитель мог бы переходить весной на цитрусовые и вызвать их заболевания. Это были важные вопросы, которые необходимо было выяснить для правильной организации мероприятий по борьбе с бактериальным некрозом.

Изучение специализации Bact. citriputeale показало, что он не является узко специализированным паразитом. Опыты по изучению специализации данной бактерии говорят о возможности ее перехода с одного вида на другой не только в пределах семейства цитрусовых, но и о способности вызывать в условиях опыта заболевание большого числа растений (сирень, тунг, чай, яблоня, груша, слива, вишня). Однако источником заражения для цитрусовых эти растения не являются. Наблюдения за началом весенней вспышки заболевания цитрусовых некрозом показали, что в Аджарии вспышка начинается перед началом вегетации цитрусовых. В это время многие восприимчивые к Bact. citriputeale растения находятся еще в периоде покоя, и вегетация их (раскрытие цветочных и листовых почек, восприимчивых к возбудителю) начинается обычно в то время, когда «вспышка некроза на цитрусовых достигает своего максимума или совсем спадает» [2]. Таким образом, перечисленные растения не могут рассматриваться как передатчики инфекции.

Поэтому необходимо было выяснить возможность сохранения Bact. citriputeale на больном растении, в срезанных больных ветках и листьях.

Прежде всего возбудитель был изолирован с веток и листьев различных видов цитрусовых, хранящихся в срезанном виде, свыше месяца. В дальнейшем периодически производились выделения бактерий как со

срезанных веток, хранившихся в лаборатории, так и с больных веток, находившихся на дереве. Было доказано, что в несрезанных ветках мандарина Bact. citriputeale может сохраняться до 7 месяцев, а лимона — до 10—12 месяцев. В срезанных больных ветках и листьях лимонов и мандаринов, находившихся на поверхности почвы, Bact. citriputeale сохраняется в течение 8—12 месяцев, не теряя своей патогенности. В больных ветках, находившихся в течение 6 месяцев (декабрь-май) в почве на глубине 10 см, бактерий выделить не удалось. Не сохраняется возбудитель бактериального некроза в остатках больных плодов, как оставленных на поверхности почвы, так и бывших в течение 10 месяцев в почве на глубине 10 см. В больных листьях, закопанных в почву, возбудитель может оставаться живым и сохранять свою патогенность до 6 месяцев.

В почве возбудитель бактериального некроза длительное время не сохраняется. Опыты по изучению его выживаемости показали, что в течение зимнего периода бактерия погибает, как в стерильной, так и нестерильной почве. Заражение плодов лимонов почвой, в которую было внесено большое количество возбудителя, не удавалось после зимовки в естественных условиях. Таким образом, почва не может рассматриваться как возможное место сохранения Bact. citriputeale в течение зимнего периода.

На основании проведенного изучения возможных путей сохранения Bact. citriputeale в период отсутствия в природе болезни можно утверждать, что основным местом резервации данной бактерии являются сами цитрусовые, на которых она и зимует. Сохраняется Bact. citriputeale как на самом дереве, в больных ветках и листьях, так и в остатках больных растений (в ветках и листьях), находящихся на поверхности почвы. Весеннее возобновление болезни может происходить в основном за счет бактерий, сохраняющих свою жизнеспособность.

Причины отсутствия заболевания цитрусовых летом

Как было уже указано выше, в течение длительного промежутка времени Bact. citriputeale находится в больных ветках на дереве в скрытом состоянии, и в естественных условиях летом болезнь не наблюдается. Каковы причины отсутствия данного заболевания в летнее время?

Существует предположение (Токин [7]), что отсутствие данного заболевания летом связано с так называемой «самостерилизацией» растения фитонцидами, которые активно продуцируются растением в летний период и действуют на патогенные для него бактерии. Механизм действия может быть бактериостатическим и бактерицидным. Хетагуровой были поставлены опыты по действию летучих фракций фитонцидов листьев цитрусовых на ряд культур Bact. citriputeale. «В то время как зимние фракции и сок листьев не давали картины стерильности даже при длительных экспозициях, летом эти фракции убивали все штаммы при экспозиции от 20 минут до 1-го часа» (цит. по Токину [7]). Следовательно, можно сделать вывод о подавлении жизнедеятельности бактерий фитонцидами.

В наших опытах по искусственному заражению в естественных условиях летом молодых и старых побегов лимонных и мандариновых деревьев получены вполне четкие результаты, говорящие о том, что при наличии благоприятных условий и достаточной инфекционной нагрузки можно вызвать заболевание и в летний период. Выделение Bact. citriputeale с веток, срезанных в летний период, также говорит о том, что возбудитель сохраняет свою жизнедеятельность и вирулентность в это время. Предварительные опыты, поставленные нами в 1950 г., показали, что Bact. citriputeale, выделенная из разных цитрусовых, оказалась нечув-

ствительной к фитонцидам лимонных и мандариновых деревьев во все времена года. Испытывалось действие сока и летучих фракций фитонцидов цитрусовых.

Очевидно, что ответ на вышепоставленный вопрос необходимо искать в определении тех своеобразных факторов взаимодействия растения-хозяина, паразита и внешней среды, которые могут привести и приводят к массовым вспышкам данного заболевания.

Известно, что понижение температуры повышает восприимчивость цитрусовых к некрозу. Температурный же оптимум Bact. citriputeale лежит в пределах от 15 до 25°, хотя бактерия может сохраняться и расти при более низких температурах. В то же время низкая температура неблагоприятна для развития растения-хозяина, понижает его жизнедеятельность и повышает восприимчивость к различным заболеваниям. В зимних условиях развитие растения прекращается, обмен веществ сведен к минимуму, растение ослаблено неблагоприятными внешними факторами (низкая температура, ветер и т. д.). Ранней весной, когда температурные условия становятся более благоприятными для развития Bact. citriputeale, а цитрусовые растения после зимы находятся в восприимчивом к заболеваниям ослабленном состоянии, при наличии высокой влажности воздуха создаются исключительно благоприятные условия для возникновения и быстрого распространеиня болезни.

Замечено, что холодная растянутая весна сильно тормозит быстрое развитие бактериального некроза и тормозит его распространение. Этот факт можно объяснить, очевидно, отсутствием благоприятных температурных условий для развития Bact. citriputeale. В то же время растение постепенно активизирует свою жизнедеятельность, повышая тем самым свою устойчивость к заболеванию. Это имело, например, место в Аджарии весной 1949 г. Весна в 1948 г. в Аджарии была ранняя и быстрая и тогда произошла сильная вспышка бактериального некроза.

Таким образом, внутреннее состояние растений, взаимодействие и сочетание благоприятных условий, необходимых для развития как растения-хозяина, так и паразита, играют, несомненно, решающую роль в возникновении и развитии бактериального некроза цитрусовых.

В летний период такое сочетание благоприятных факторов для возникновения и развития бактериального некроза, как правило, отсутствует. Растение и все его органы в этот период находятся не в ослабленном состоянии, а в процессе активной вегетации. В этот период физиологически активного состояния все процессы в растительном организме (фотосинтез, дыхание, и т. д) происходят усиленно и устойчивость растения к различным заболеваниям соответственно усиливается.

В то же время для развития Bact. citriputeale условия складываются неблагоприятно. Температура обычно в этот период не соответствует оптимальной температуре, необходимой для роста бактерий; стало быть, отсутствуют благоприятные условия для накапливания инфекционного начала в организме растения.

Вопрос о наличии в естественных условиях заболевания бактериальным некрозом цитрусовых в осенний период в наших субтропиках еще не ясен и требует дальнейшего изучения.

Меры борьбы с бактериальным некрозом цитрусовых культур

Хотя изучение данного заболевания еще продолжается, уже сейчас совершенно ясно, что борьба с ним должна основываться прежде всего на соблюдении правильной агротехники культуры цитрусовых. Сюда входят знание закономерностей роста и развития цитрусовых деревьев, особенностей их развития и требования к окружающей среде.

В естественных условиях на плантациях проникновению Bact. citripu-

teale в растения и распространению его особенно способствуют ветры с дождями. Поэтому важным мероприятием в борьбе с бактериальным некрозом является посадка ветрозащитных полос, особенно вокруг участков, открытых действию ветров. Ветрозащитная полоса препятствует как распространению инфекции, так и уменьшает возможность повреждения растений.

Больные ветки являются основным источником для весеннего возобновления заболевания. Поэтому летняя и осенняя обрезка больных ветвей, удаление их с плантаций и уничтожение имеют большое значение в борьбе с некрозом. Необходимо содержать цитрусовые насаждения в чистоте, удалять осенью и ранней весной опавшую листву с плантаций и сжигать ее.

Разрабатываются мероприятия и по химическим методам борьбы с бактериальным некрозом в условиях советских субтропиков. Первые опыты показали, что применяемое во всех цитрусовых хозяйствах Аджарии апрельское опрыскивание цитрусовых однопроцентной бордосской жидкостью в борьбе с этим заболеванием мало эффективно. Опыты 1950 г. показали, что высокой эффективностью обладают ранне-весенние (начало марта) опрыскивания тем же фунгисидом. Эффективность опрыскивания еще больше повышается, когда оно сочетается с осенней обрезкой больных ветвей. Работа в этом направлении продолжается. В заключение считаю своим долгом выразить глубокую и сердечную благодарность проф. М. В. Горленко за систематическое руководство и помощь в работе.

Выводы

1. Бактериальный некроз цитрусовых вызывается Bacterium citriputeale C. O. Smith. При этом свойства изолированных культур не отличаются от описанных в литературе.

2. К заболеванию бактериальным некрозом восприимчивы почти все виды цитрусовых, произрастающих на Черноморском побережье Кавказа, в том числе многие гибридные формы.

3. Бактериальный некроз цитрусовых в наших условиях поражает стебли, листья, черешки и плоды.

4. В условиях Черноморского побережья Кавказа данное заболевание наблюдается в основном в весенний период (март-май).

5. В естественных условиях Bact. citriputeale может проникать в растительный организм только через повреждения.

6. Bact. citriputeale не является узко специализированным паразитом и способен к переходу с одного вида на другой в пределах семейства цитрусовых.

7. Bact. citriputeale являются хорошо приспособленным паразитом, способным жить при значительных колебаниях температуры. Оптимальная температура для роста колоний Bact. citriputeale лежит в пределах от 15 до 25°. Рост колоний возможен также при температуре, близкой к нулю. Температура выше 25° начинает тормозить рост колоний бактерий.

8. Bact. citriputeale способна длительное время сохраняться в больных ветках на дереве и в срезанных ветках и опавших листьях на поверхности почвы. В остатках больных растений, закопанных в почву (кроме листьев), Bact. citriputeale в течение зимнего периода погибает. Почва не может служить местом резервации Bact. citriputeale.

9. На основании предварительных материалов, для борьбы с бактериальным некрозом цитрусовых необходимо применять следующие профилактические мероприятия:

а) строгое соблюдение всех правил агротехники цитрусовых;

б) посадка ветрозащитных полос;

в) осенняя обрезка больных ветвей, удаление их с цитрусовых плантаций и уничтожение;

г) сбор и уничтожение опавших листьев;

д) осенне- и ранне-весенние (начало марта) опрыскивания цитрусовых однопроцентной бордосской жидкостью.

Московская станция
Всесоюзного института защиты растений

Получено 25. X. 1949 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А. Д. Кадочная культура лимона. Крымиздат, 1949.
2. Горленко М. В. и Шнейдер Ю. И. Бактериальный некроз цитрусовых и меры борьбы с ним. XIX Пленум Секции защиты растений ВАСХНИЛ. Тезисы докладов, вып. II, 1949.
3. Израильский В. П. и Степунина А. В. Серологические исследования растений, поражаемых бактериозами. Микробиология, IX, вып. 9—10, 1940.
4. Израильский В. П. и Степунина А. В. Исследования бактериозов плодовых деревьев (персики и абрикосы) в Армении. Микробиология, IX, вып. 9—10, 1940.
5. Лобик А. И. Болезни цитрусовых культур. В книге «Справочник агронома по защите растений, 1948, стр. 753.
6. Нагорный Н. И., Гикашвили К. Г., Сакварелидзе Н. А. Материалы к микрофлоре цитрусовых культур в Груз. ССР. Известия Грузинской опытной станции защиты растений, № 2, 1940.
7. Токин Б. П. О поисках новых фитонцидов. Природа, № 6, 1949.

МОЖЕТ ЛИ КОРОЕД HYPOTHENEMUS LEZHAVAI PIATN. РАСПРОСТРАНЯТЬ ИНФЕКЦИОННОЕ УСЫХАНИЕ ЛИМОНОВ («МАЛЬСЕККО»)?

К. М. Степанов

Для заражения лимонов и других цитрусовых инфекционным усыханием («мальсекко») важное значение имеет наличие ран на побегах и ветвях. В этом случае осуществляется непосредственный контакт спор Deuterophoma tracheiphila Petri (возбудителя болезни) с сосудами древесины. Гриб проникает в них, и в итоге возникает типичный трахеомикоз.

В природе ранения лимонов вызываются обрезкой и пинцировкой деревьев, неосторожным обращением с последними при обработке почвы, саморанением лимона шипами при ветре и т. п. В ранки попадают споры D. tracheiphila и, если имеются благоприятные условия температуры и влажности, они прорастают и вызывают заражение дерева.

Распространение спор этого гриба осуществляется разными агентами, среди которых можно допускать насекомых. Значение насекомых возрастает в связи с тем, что они могут не только переносить заразное начало, но и содействовать его проникновению в ткани растения благодаря своим повреждениям. Примеры такого распространения инфекционных болезней растений весьма многочисленны.

По природе заражения и течению патологического процесса инфекционное усыхание лимонов близко напоминает так называемую «голландскую болезнь», или графиоз ильмов, вызываемый грибом Ophiostoma ulmi (Schwarz) Nannf. (= Ceratostomella ulmi [Schwarz] Buism.).

Эту болезнь некоторые называют «мальсекко» ильмов. Как известно, в распространении заразного начала графиоза и заражения им деревьев деятельное участие принимают различные короеды: Scolytus multistriatus Marsh., S. scolytus F., S. pygmaeus F. и другие. Эта аналогия дала повод предполагать, что для инфекционного усыхания лимонов такую двойную роль (перенос заразного начала и его внедрение в ткань хозяина) может играть короед Hypothenemus lezhavai Piatn.

По наведенным справкам в литературе, этот короед встречается на многих древесных породах, относящихся к разнообразным семействам. Лежава [1], в честь которого назван этот короед, находил его в Западной Грузии на таких растениях, как Morus sp., Tilia sp., Zelkova, белая акация, Gleditschia, Ailanthus sp., Salix sp., Fraxinus sp., Laurus nobilis, Prunus sp., Ficus sp., грецкий орех, Pinus sp. и различных цитрусах и близких к ним видах: апельсин, лимон, мандарин, ишумикан, кинкан, трифолиата. По указанию этого автора, цитрусовые «весьма чувствительно повреждаются этим видом».

В качестве вредителя цитрусов Батумского побережья этот короед указывается Хачапуридзе [4]. По сообщению Тулашвили [3], Hypothenemus lezhavai встречается в том же районе на всех видах цитрусовых. Он локализуется, главным образом, в старых садах и поражает большей частью деревья, уже в значительной степени ослабленные от вредоносной деятельности щитовок, или же пострадавшие от мороза. В некоторых случаях, при совокупном воздействии на растение и щитовок и короедов, может иметь место гибель целого дерева.

Эти указания и вышеприведенные соображения заставили нас ближе познакомиться с этим короедом, как возможным переносчиком «мальсекко» лимонов. Как показали наши наблюдения, очень часто, возможно, во всех случаях усыхания лимонных и других цитрусовых деревьев или отдельных ветвей и побегов, имеет место заселение их в той или иной мере короедом H. lezhavai. По нашим наблюдениям, этот короед обычно также заселяет ветви, побеги и целые деревья лимонов, пораженные или усыхающие от инфекционного усыхания. Мы отмечали это также на апельсинах.

Заселение короедом может происходить в ранней фазе заболевания. Так, мы наблюдали входные отверстия H. lezhavai в листовых следах жировых побегов лимона, совершенно зеленых, но уже потерявших листву, в связи с поражением их инфекционным усханием.

Короед встречался нам в значительных количествах не только на деревьях, стоящих на корне и находящихся в различных стадиях усыхания, но и на лежащих на земле в саду сухих веточках и их отрезках. Возникает вопрос, может ли этот короед вступать в контакт со спорами D. tracheiphila при заселении им больных и усыхающих от «мальсекко» деревьев.

Возможность такого контакта очевидна уже из того, что ходы этого короеда часто наблюдаются в листовых следах, на которых, как известно, обычно образуются пикниды D. tracheiphila. Совместное нахождение короеда и пикнид на листовых следах мы отмечали многократно.

Контакт короеда с пикнидами имеет место не только в листовых следах. При исследовании больных ветвей на дереве и их обломков и отрезков, лежащих на земле, мы часто встречали под отстающей корой многочисленные пикниды D. tracheiphila. Тут же отмечались ходы короеда H. lezhavai с живыми, передвигающимися жуками. При увлажнении пикнид, из них выступают споры, которые загрязняют жуков. Таким образом, больное усыхающее дерево и его части играют двойную роль источников заразного начала «мальсекко» и запаса жука-короеда.

Для решения вопроса о роли короеда H. lezhavai в качестве переносчика инфекционного усыхания лимонов, летом 1948 г. нами был поставлен опыт в Ленинграде на двух однолетних саженцах лимона сорта «Новогрузинский». Эти саженцы были доставлены в апреле того же года из района, где инфекционное усыхание отсутствует. Этим обеспечивалась чистота опыта. Саженцы были высажены в вазоны, и до опыта и после его постановки они находились на окне в лаборатории.

7.VII.1948 г. на стебель одного саженца был надет изолятор из полупергаментной бумаги. В него было высажено около 30 жуков H. lezhavai, извлеченных из сухих веточек лимона, которые были собраны 12.VI того же года в Аджарии. Предварительно в стерильной воде приготовлялась густая суспензия пикноспор D. tracheiphila, взятых из культуры гриба на стерильных стеблях донника [1]. Жуки омывались в этой суспензии, затем подсушивались в лаборатории на открытом воздухе и высаживались в указанный изолятор. При осмотре этого саженца 26.VII в изоляторе было обнаружено 22 мертвых темных и 3 светлых (молодых) жука. На стебле лимона найдено входное отверстие жука в листовой след и такое же отверстие в коре, причем в последнем случае был виден конец брюшка короеда, повидимому, мертвого. Кроме того, на опробковевшем месте коры стебля было обнаружено 3 выеденных участка.

9.VIII.1948 г. была произведена подсадка на стебель второго саженца 17 жуков H. lezhavai и 17.VIII дополнительно еще 12 жуков того же происхождения. Предварительного искусственного заражения жуков спорами не производилось. При осмотре этого саженца 25.VIII в изоля-

[1] Применялся вирулентный штамм.

торе было найдено мертвыми 11 темных и один светлый жук и живыми — два светлых жука. В этом случае были обнаружены более частые повреждения саженца короедом. Так, на стебле было отмечено три выеденных участка на зеленой коре (в одном случае — удлиненный выгрыз, продолжавшийся под корой). Затем было найдено одно входное отверстие в свежем листовом следе. Наконец, было обнаружено входное отверстие на зеленом участке коры (было видно брюшко короеда) и, кроме того, четыре входных отверстия на слегка опробковевших участках коры. В трех отверстиях были заметны концы брюшка короеда.

В половине ноября того же года, т. е. примерно через 4 месяца после постановки опыта, на первом саженце лимона, на который высаживались жуки, искусственно зараженные спорами, начали опадать зеленые листья. В дальнейшем листопад усилился. При осмотре саженца 10.I.1949 г. на нем оставалось всего три листа. Весною того же года возобновился более или менее нормальный рост только на одной стороне стебля этого саженца. В октябре на верхнем побеге опало три зеленых листа. На противоположной стороне после опадения листьев в 1948 г. рост не возобновлялся. Почти на всем протяжении этой стороны кора остается до сего времени зеленой. Здесь наблюдалось раскрывание нескольких почек, но образовавшиеся листочки вскоре же опадали. Вершина главного стебля и верхушечный побег на обезлиственной стороне саженца усохли. 14.X.1949 г. усохшие части, с захватом зеленых участков, были срезаны, и кусочки их высеяны на картофельный агар. На одном из кусочков, на бурой мертвой коре вскоре появились типичные пикниды D. tracheiphila.

Что касается второго саженца, на который высаживались жуки, не зараженные спорами, то достоверных признаков поражения на нем пока не было обнаружено. До последнего времени (ноябрь 1949 г.) этот саженец остается внешне нормально растущим, если не считать единичных опавших листьев.

Как было указано выше, подопытные саженцы были завезены из незараженной местности. Следовательно, описанная выше картина заболевания первого саженца, свойственная «мальсекко», и появление на усохших частях пикнид D. tracheiphila несомненно обязаны заражению, осуществленному подсадкой зараженных жуков H. lezhavai. Правда, течение болезни протекает медленно, что можно объяснять условиями лаборатории.

Описанный опыт, по нашему мнению, доказывает возможность передачи этим короедом инфекционного усыхания. Однако возникает вопрос: посещает ли короед H. lezhavai здоровые цитрусы, повреждает ли он в природе зеленые побеги и веточки и, следовательно, может ли он переносить на здоровые деревья заразное начало и способствовать его внедрению в ткани растений? К высказанному нами предположению, что короед H. lezhavai может распространять «мальсекко», некоторые энтомологи и фитопатологи отнеслись отрицательно. Единственным мотивом такого отношения являлось то обстоятельство, что этот короед заселяет только ослабленные и умирающие деревья, и, следовательно, он не может передавать болезнь здоровым растениям.

Действительно, короед H. lezhavai заселяет ослабленные и усыхающие деревья. Это известно для разнообразных короедов. С другой стороны, для короедов известно так называемое дополнительное питание. Оно проявляется в том, что молодые жуки, выходящие из усыхающих и мертвых деревьев, в которых они прошли свое предимагинальное развитие, для созревания половой продукции, требуют питания зелеными частями растений, в частности почками. Подобное имеет место, очевидно, и у H. lezhavai. Об этом говорит описанный нами опыт подсадки жуков на зеленый стебель лимона. Как было указано выше, жуки выедали зеленую кору и вгрызались в листовые следы.

Чтобы подтвердить еще раз это положение, осенью 1948 г. мы произвели подсадку жуков H. lezhavai в условиях сада (в Аджарии) к взрослым деревьям и однолетним саженцам.

29.IX—4.X на вершины зеленых побегов лимона надевались изоляторы из полупергаментной бумаги. Всего было изолировано три побега летнего и один побег последнего роста (на нем имелись еще пурпуровые листочки). В каждый изолятор подсаживалось по 17—21 темному и 4—9 светлых жуков H. lezhavai. 18.X изолированные вершины побе-

Таблица

Подсадка жуков Hypothenemus lezhavai Piatn. на саженцы лимона

№ саженцев	Высажено жуков		Оказалось в изоляторе		Наличие повреждений
	темных	светлых	темных	светлых	
4	20	11	3/0	1/1	В основании привоя на остатке срезанной веточки 4 выеденных участка; поверхность среза сильно изъедена, ползают жуки, в некоторых ходах видно брюшко. Такая же картина на остатке другой веточки. На пробковой полосе зеленой коры вгрызающийся короед.
5	20	10	3/6	2/1	В основании привоя на опробковевшем месте значительный участок выеденной коры; в обнаженной древесине поверхностные ходы короеда. Тут же в расщелине коры короед, вгрызающийся в древесину. Несколько выше выеденный участок коры и входное отверстие в листовом следе.
2	22	10	11/2	1/1	В основании привоя глубокое входное отверстие в зеленой коре; рядом поверхностное повреждение коры. Выше еще 4 поверхностных повреждения зеленой коры. Далее неглубокий вход в кору. В листовом следе входное отверстие.
6	23	9	5/2	3/1	Около шипа на бугорке (спящая почка) выеденный участок зеленой коры. В основании привоя на зеленой коре 2 продольных и 2 неправильных выеденных участка. Входное отверстие в остаток черешка (видно брюшко короеда). На некротическом участке коры еще входное отверстие.
3	15	5	5/0	0/0	В основании привоя на опробковевшем участке коры входное отверстие.
8	15	5	6/2	0/0	В основании привоя 3 входных отверстия на зеленой коре.
7	33	2	14/9	0/0	В основании остатка черешка входное отверстие. Выше выеденный участок зеленой коры, там же выеденный участок некротической коры.
1	33	2	1/3	0/0	В остатке черешка входное отверстие. В основании участка срезанной веточки на опробковевшем участке входное отверстие (видно брюшко короеда). Тут же еще 2 входных отверстия. На опробковевшем участке коры поверхностное выедание. Вгрызающийся жук под мацерированной, опробковевшей корой.

Примечание. В числителе указаны живые жуки, в знаменателе — мертвые.

гов были срезаны и тщательно осмотрены. На одном побеге летнего прироста был обнаружен жук, подгрызший почку и затем внедрившийся в листовой след.

5—12.X того же года по методу, применявшемуся в лабораторном опыте, была произведена подсадка короедов на стебли восьми саженцев лимона сорта «Новогрузинский». 19—20.X изоляторы были сняты и произведен тщательный осмотр саженцев. Результаты представлены в таблице.

Как видно из данных таблицы, к восьми саженцам лимона было высажено 181 темный жук и 54 светлых. При удалении изоляторов в них было обнаружено мертвыми 13,3% темных жуков и 7,4% светлых жуков. Смертность жуков в изоляторах была, повидимому, обычной. Следовательно, в изоляторе короеды не испытывали больших лишений и могли свободно проявлять свою склонность к повреждению и въеданию в здоровые, зеленые части лимона. Действительно, в данном опыте имели место частые повреждения саженцев короедом. Здесь были отмечены разнообразные случаи: выедание опробковевшей и совершенно зеленой коры вплоть до древесины и даже ходы в последней, внедрение короедов в кору и листовые следы, повреждения спящей почки. Нет оснований считать, что описанные повреждения были искусственно вызваны ненормальной обстановкой, в которой находились жуки. В природе, несомненно, также должны иметь место подобные случаи.

Описанные опыты подсадки короеда H. lezhavai на зеленые побеги и стебли саженцев лимона свидетельствуют о повреждаемости их этим короедом. Отдельные случаи повреждений — наличие выеданий коры (до древесины) без внедрения жука, повреждения почек говорят о наличии у него дополнительного питания. Поскольку таковое имеет место, то инокуляция короедом здоровых деревьев, следовательно, передача им «мальсекко» является возможной.

О такой возможности также говорит следующее обстоятельство. Для многих короедов известно, что при обильном размножении имеет место нападение их на здоровые деревья не только в целях дополнительного питания, но и заселения, хотя такое нападение сопровождается гибелью насекомых. При повторных повреждениях может возникать известное ослабление дерева, что уже делает возможным его заселение короедом.

В наших опытах подсадки короеда H. lezhavai на побеги и стебли лимонов отмечены повреждения, сопровождающиеся гибелью жуков. Это указывает на наличие таких попыток к заселению здоровых деревьев и у данного короеда. Таким образом, возможности заражения цитрусов инфекционным усыханием при помощи короеда H. lezhavai расширяются.

На основании приведенных данных можно представить примерную картину распространения короедом болезни. Лимонные деревья (и другие цитрусы), пораженные «мальсекко», обычно заселяются короедом H. lezhavai, и в них выводится новое поколение этого короеда. Отрождающиеся жуки находятся в непосредственном контакте с пикнидами D. tracheiphila и при увлажнении последних заражаются спорами. При дополнительном питании жуков, осуществляемом на здоровых, зеленых побегах и веточках, а также попытках к заселению здоровых деревьев, происходит инокуляция последних, и, таким образом, передача «мальсекко».

Можно считать несомненным, что короед H. lezhavai является одним из агентов распространения «мальсекко». Возможно взаимное приспособление короеда и гриба друг к другу. На подобное указывают исследователи графиоза ильмов. Это приспособление выражается в том, что гриб, поражая растения, «подготавливает» субстрат для короеда, а короед способствует заражению здоровых деревьев. Правда, в отношении короеда H. lezhavai и гриба D. tracheiphila это является пока гипотезой, требующей подтверждения.

Как сообщалось выше, этот короед повреждает разнообразные древесные породы. Это обстоятельство говорит о том, что среди различных агентов распространения «мальсекко» в зараженных хозяйствах короед H. lezhavai должен иметь небольшой удельный вес. Тем не менее деятельность короеда может усилить прогрессирование болезни в таких хозяйствах.

Роль короеда может оказаться более важной в другом отношении. Наблюдаются случаи возникновения первичного фокуса инфекции «мальсекко» на новом участке зараженного хозяйства или вообще в новом хозяйстве, удаленном иногда на несколько километров от очагов болезни. Эти случаи могут быть обязаны, конечно, разным причинам, в частности неосторожному заносу больного саженца или пораженной части цитрусового дерева (обрезков ветвей, листьев, плодов). Как показали исследования нашей лаборатории, больные части дерева длительно сохраняют в себе возбудителя «мальсекко», который при благоприятных условиях температуры и влажности начинает на них обильно спороносить (Степанов [2]).

Первичные фокусы инфекции в удаленных хозяйствах могут быть также обязаны короеду H. lezhavai. Этот короед обладает способностью летать. При некоторых условиях, особенно при сильном ветре, короед может распространяться на далекие расстояния, во всяком случае на несколько километров. Подобное известно для Scolytus multistriatus, одного из переносчиков графиоза ильмов. Это обстоятельство увеличивает опасность прогрессирования болезни. Поэтому в комплексе санитарных мероприятий по борьбе с «мальсекко» должны быть учтены меры, направленные против короеда.

За ценные указания приношу благодарность проф. В. Н. Старк.

Выводы

1. Лимонные деревья, пораженные инфекционным усыханием, обычно заселяются короедом Hypothenemus lezhavai Piatn. Соприкасаясь с плодоношениями возбудителя болезни, жуки могут заспориться.

2. Здоровые растения лимона могут заражаться инфекционным усыханием при помощи короеда. Короед может повреждать зеленые здоровые побеги лимона, и поэтому распространение болезни при его помощи является вполне вероятным.

3. Повидимому, короед может не только способствовать прогрессированию болезни в зараженных хозяйствах, но и быть одной из причин возникновения болезни в хозяйствах, удаленных от очагов инфекции. В связи с этим короед Hypothenemus pezhavai может иметь эпифитотиологическое значение.

4. При проведении санитарно-гигиенических мероприятий в отношении инфекционного усыхания лимона необходимо обращать внимание на меры борьбы с короедом.

Всесоюзный институт защиты растений
Ленинград

Получено 13. 1. 1950 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лежава В. Материалы к познанию короедов Грузии. НКЗ Грузии. Бюро борьбы с вредителями леса. Под ред. и с резюме Г. К. Пятницкого. Ленинград, стр. 1, 1929.
2. Степанов К. М. Об источниках заразного начала инфекционного усыхания лимонов («мальсекко»). Доклады ВАСХНИЛ, вып. 8, 39, 1950.
3. Тулашвили Н. Наблюдения над вредителями чая и цитрусовых Батумского побережья в течение 1927—1928 года. Изв. Отд. защ. раст. НКЗ Грузии, № 1, 184. 1930.
4. Хачапуридзе Н. Обзор главнейших вредителей с.-х. Грузии; там же, стр. 13. 1930.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МЕЧЕНЫХ АТОМОВ В МИКРОБИОЛОГИИ

(Обзор)

А. С. Коникова и М. Г. Крицман

Бурное развитие исследований в области обмена веществ за последние десятилетия многим обязано блестящему усовершенствованию методов изучения химических процессов живой материи и в первую очередь применению метода меченых атомов.

Многочисленными работами с помощью этого метода установлено, что можно исследовать обмен веществ в целом организме, не нарушая экспериментальным вмешательством нормального хода процессов, так как оказалось возможным, введя вещества, меченные изотопом, в организм, проследить за их превращением благодаря этому признаку.

Метод меченых атомов позволил наблюдать за качественными и количественными превращениями ряда химических соединений при различных состояниях организма. Значение метода меченых атомов чрезвычайно велико тем, что он определил возникновение новой системы экспериментов, дающих возможность вскрыть специфические закономерности биохимических превращений живой материи в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, растений и животных.

Развитию этого метода предшествовал ряд блестящих открытий в области ядерной физики, приведших к выяснению структуры ядра, открытию стабильных и радиоактивных изотопов.

Рядом исследований было показано, что меченые молекулы в процессе обмена веществ испытывают те же химические превращения, каким подвергаются обычные молекулы данного химического соединения; в силу этого их поведение отражает адэкватно судьбу одноименных химических соединений в организме [1].

Метод меченых атомов был весьма плодотворно применен для исследования обмена веществ у микробов. Больше того, в ряде этих работ микробы служили в качестве модели химических процессов живой клетки и полученные при этом данные способствовали открытию и расшифровке многих процессов, свойственных большинству видов живых организмов.

К таким явлениям относится открытый Wood и Werkman (1940) сначала только у Bac. propionatum с помощью меченого углерода процесс фиксации углекислоты, обнаруженный впоследствии у большинства одноклеточных и многоклеточных организмов и даже у высших форм животных.

Как упоминалось выше, применение меченого углерода в качестве индикатора при исследовании обмена веществ у микробов привело к от-

---

[1] Меченые атомы определенного элемента представляют собой смесь его изомеров, которая искусственно обогащена одним из них, находящимся в природных соединениях в низкой концентрации, либо обладающим радиоактивным распадом. Такие атомы благодаря особым физическим свойствам (иному атомному весу или радиоактивности) могут быть обнаружены среди других атомов того же элемента.

Будучи введены в молекулы любого вещества как примесь к обычным атомам того же элемента, они, не меняя химических свойств последних, дают возможность проследить за этими молекулами и количественно их определить.

крытию ряда новых и принципиально важных закономерностей, которые определили новые представления не только в биохимии микробов, но и животных.

Наиболее выдающимся исследованием, сделанным с помощью изотопа углерода, является открытие процесса фиксации углекислоты у гетеротрофных организмов [Wood и Werkman и другие (1940)]. До этого считалось твердо установленным, что процесс фиксации углекислоты является монополией автотрофных организмов и что использование углекислоты ограничивается процессом фотосинтеза. Это представление господствовало долгое время, несмотря даже на то, что результаты балансных опытов Вуда и Веркмана (1935, 1936), полученные при пропионовокислом брожении глицерина, вполне отчетливо показавшие образование янтарной кислоты, не могли иметь иной интерпретации, как фиксация углекислоты в трехуглеродистое соединение.

Окончательное доказательство этого явления последовало лишь после того, как Вуд и Веркман (1940), используя углекислоту, меченную тяжелым изотопом углерода (C^{13}) при пропионовокислом брожении глицерина, показали наличие меченой углекислоты в карбоксильной группе янтарной кислоты.

Согласно представлению упомянутых авторов, образование янтарной кислоты при сбраживании глицерина происходит в результате многоэтапного процесса. Первой стадией его является дегидрирование глицерина с образованием пировиноградной кислоты, согласно уравнению:

$$CH_2OH.CHOH.CH_2OH \xrightarrow{-4H} CH_3.CO.COOH,$$

после чего из пировиноградной кислоты в присутствии меченой углекислоты при пропионовокислом брожении происходило образование янтарной кислоты, как указано ниже:

$$CH_3.CO.COOH + C^{13}O_2 \rightarrow HOOC^{13}.CH_2.CO.COOH.$$

$$HOOC^{13}.CH_2.CO.COOH + 2H \rightarrow HOOC^{13}.CH_2.CHOH.COOH.$$

$$HOOC^{13}.CH_2.CHOH.COOH - H_2O \rightarrow HOOC^{13}.CH : CH.COOH.$$

$$HOOC^{13}.CH : CH.COOH + 2H \rightarrow HOOC^{13}.CH_2.CH_2.COOH$$

Таким образом, пировиноградная кислота является промежуточным субстратом, который фиксирует углекислоту. Эти данные были полностью воспроизведены в исследованиях других авторов.

Кроме того, была доказана обратимость этого процесса

$$CH_3.CO.COOH + C^{13}O_2 \rightleftarrows HOOC^{13}.CH_2.CO.COOH.$$

Krampitz и Werkman (1941, 1943) выделили ферментные препараты из Micrococcus lysodecticus, катализирующие процесс фиксации углекислоты при превращении пировиноградной кислоты в щавелевоуксусную кислоту. Lardy и Burris (1949) в опытах с Lactobacillus arabinosus показали, что биотин играет роль катализатора процесса фиксации углекислоты при образовании дикарбоновых кислот. После открытия энзиматического процесса фиксации углекислоты пировиноградной кислотой была проведена большая серия работ, показавших многообразие процессов, протекающих с использованием свободной углекислоты при удлинении углеродных цепочек органических соединений гетеротрофными организмами. В настоящее время достоверно доказана фиксация углекислоты с образованием органических соединений весьма различной длины углеродной цепи.

Накопившиеся данные показали, что этот процесс утилизации углекислоты широко распространен у гетеротрофных бактерий.

В табл. 1 сведены данные, полученные с помощью меченой CO_2, по фиксации микроорганизмами углекислоты в органические кислоты. Во всех перечисленных в этой таблице соединениях соответствующий изотоп обнаружен в углероде карбоксильной группы. Эти данные привели к представлению о том, что реакции внедрения углекислоты в эти соединения аналогичны предположенным при образовании янтарной кислоты в процессе пропионовокислого брожения.

Кроме того, изотоп углерода в уксусной кислоте мог также явиться

Таблица 1

Утилизация углекислоты, добавленной в виде C^*O_2 и $NaHC^*O_3$, различными микроорганизмами

Микроорганизм	Субстраты	Соединения, в которых был обнаружен изотоп углерода
Propionibacter pentosaceum	Глицерин	Янтарная к-та Пропионовая к-та Пропилов. спирт
Propionibacter pentosaceum	Глюкоза	Янтарная к-та
Bact. coli " " " " " " " "	Галактоза Пировиногр. к-та " " " " " "	Янтарная к-та Янтарная " Фумаровая к-та Яблочная " Аспарагиновая к-та
Bact. coli	Глюкоза	Фумаровая к-та
Aerobacter indologens	Глюкоза	Янтарная к-та Молочная " Уксусная " Муравьиная к-та
Streptococcus paracitrovorum	Цитрат	Янтарная к-та
Streptococcus paracitrovorum	Глюкоза	Янтарная к-та Молочная "
Clostridium Welchii	Глюкоза	Уксусная к-та Молочная "
Clostridium acetobutylicum	Глюкоза	Молочная к-та
Proteus vulgaris	Глюкоза	Янтарная к-та Молочная "
Staphylococcus candidus	Глюкоза	Янтарная к-та Молочная "

результатом реакции фиксации углекислоты в пировиноградной кислоте с образованием четырехуглеродистых дикарбоновых соединений, продуктами распада которых могли быть две молекулы уксусной кислоты.

В настоящее время благодаря изотопному методу стало известно больше 20 различных соединений, которые образуются путем фиксации углекислоты гетеротрофными организмами.

Биологический синтез метана

Особый интерес представляют исследования, показавшие способность ряда гетеротрофных организмов синтезировать метан путем восстановления углекислоты.

Barker, Ruben и Kamen (1940), используя радиоактивный изотоп углерода $C^{11}O_2$, провели серию исследований с культурами Metanobacterium Omeliansky, направленных на изучение реакции восстановления углекислоты до метана. В результате проведенных исследований авторы пришли к выводу, что все типы реакции, катализируемые метанообразующими бактериями, являются окислительно-восстановительными, в которых углекислота служит акцептором водорода; при этом последняя восстанавливается до метана, согласно схеме:

$$4H_2A + C^{11}O_2 \rightarrow 4A + 2H_2O + C^{11}H_4.$$

В соответствии с этим было показано, что при образовании метана, в процессе сбраживания этилового и бутилового спиртов и масляной кислоты культурами Metanobacterium Omeliansky исчезает эквимолекулярное количество углекислоты и происходит образование метана по уравнению

$$2C_2H_5OH + C^{11}O_2 \rightarrow 2CH_3OH + C^{11}H_4.$$

При этом весь меченый углерод был обнаружен в метане. В связи с тем, что упомянутая реакция протекает с большой скоростью и практически необратима, она может с большим успехом быть использована для быстрого получения больших количеств метана с меченым углеродом.

Биологический синтез муравьиной кислоты

Другой весьма интересной реакцией в процессе обмена веществ у микробов, расшифрованной с помощью метода меченых атомов, является образование муравьиной кислоты путем восстановления углекислоты.

Wood, Werkman и др. (1941) показали, что B. coli может восстанавливать углекислоту в присутствии газообразного водорода до муравьиной кислоты. Кроме того, у Aerobacter indologens, Clostridium butylicum с помощью $C^{13}O_2$ было обнаружено образование муравьиной кислоты при сбраживании глюкозы.

В связи с тем, что в этих опытах муравьиная кислота содержала более высокую концентрацию изотопа, чем карбоксильная группа присутствовавшей пировиноградной кислоты, было отброшено разделявшееся рядом исследователей представление, что последняя является промежуточным соединением при образовании муравьиной кислоты.

Более высокая концентрация изотопа в муравьиной кислоте указывает, что последняя образуется в этой реакции путем прямого восстановления углекислоты.

Биологический синтез уксусной кислоты

Особо детальному изучению подверглись процессы образования уксусной кислоты у различных бактерий.

Barker и Kamen (1945) изотопным методом выясняли пути образования уксусной кислоты при анаэробном сбраживании глюкозы у Clostri-

dium thermoaceticum; ими было показано, что практически вся глюкоза переходит в уксусную кислоту

$$\text{I.}\quad C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3.COOH,$$

повидимому, проходя через следующие стадии реакции:

$$\text{II.}\quad C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3.COOH + 2CO_2 + 8H.$$

При проведении этой реакции в присутствии меченой углекислоты было доказано, что последняя в свою очередь восстанавливается до уксусной кислоты:

$$\text{III.}\quad 8H + 2CO_2 \rightarrow CH_3.COOH + 2H_2O.$$

К этому представлению можно было притти в связи с тем, что при анализе уксусной кислоты на наличие изотопа углерода оказалось, что меченый углерод равномерно распределен между ее метильной и карбоксильной группами.

Таким образом, значительная часть уксусной кислоты при анаэробном сбраживании глюкозы у Clostridium thermoaceticum образуется из двух молекул углекислоты, согласно уравнению (III).

Эти данные в значительной степени расшифровывают механизм образования уксусной кислоты из глюкозы. Они указывают, что при этом образование уксусной кислоты не является результатом только реакции дисмутации глюкозы, а что наряду с ней имеет место окисление последней до углекислоты с последующим восстановлением и конденсацией углекислоты до уксусной кислоты.

Этими же авторами с помощью долговечного радиоактивного углерода (C^{14}) исследовалось образование уксусной кислоты при сбраживании молочной кислоты. Они показали, что наряду с образованием уксусной кислоты происходит выделение углекислоты. В образовавшихся уксусной и масляной кислотах обнаружен изотоп C^{14} во всех углеродах.

Детальный механизм образования этих кислот при сбраживании молочной кислоты окончательно не выяснен.

Barker и др. (1945) на основании данных опытов по сбраживанию молочной кислоты в присутствии меченой углекислоты $C^{14}O_2$ выдвигают представление о следующем пути образования уксусной кислоты:

$$CH_3.CHOH.COOH + H_2O \rightarrow CH_3.COOH + CO_2 + 4H,$$

$$2CO_2 + 8H \rightarrow CH_3.COOH + 2H_2O,$$

$$2CH_3.COOH + 4H \rightarrow CH_3.CH_2.CH_2.COOH + 2H_2O.$$

Эти данные указывают, что уксусная и масляная кислоты образуются путем конденсации углекислоты.

Как было показано с помощью меченой углекислоты, правда, только у Clostridium cylindrosporum при сбраживании мочевой кислоты в присутствии CO_2 происходит образование меченой уксусной кислоты наряду с глицином. При исследовании обнаружено, что содержание изотопа C^{14} в метильном углероде уксусной кислоты в два раза больше, чем в углероде карбоксила, в то время как в глицине меченый углерод обнаруживается в основном только в карбоксиле.

Такое распределение изотопа может происходить в результате того, что углерод метильной группы и углерод карбоксила уксусной кислоты имеют частично различное происхождение. Низкое содержание изотопа C^{14} в углероде карбоксила указывает, что он происходит не только из меченой углекислоты, но также прямо из углерода молочной кислоты. Высокая концентрация изотопа в углероде метильной группы уксусной кислоты указывает, что он в основном происходит из углекислоты, так

же как карбоксильный углерод, глицина, концентрация радиоизотопа которого сходна с таковой метильной группы уксусной кислоты.

Отсутствие изотопа C^{14} в углероде метильной группы глицина указывает, что он образуется иным путем, чем уксусная кислота, и что не существует взаимного перехода между этими двумя соединениями.

При исследовании Barker, Volgani и Carbon (1948) превращения глицина в опытах с Diplococcus glycinophilus было также показано с помощью меченого углерода отсутствие у этих бактерий непосредственного перехода глицина в уксусную кислоту и отражена возможность образования последней из карбоксила глицина. Однако не исключена вероятность образования у этих бактерий уксусной кислоты из метильных углеродов глицина в результате конденсации двух молекул глицина и последующего превращения с потерей боковых углеродов.

С помощью меченой углекислоты Barker и Berk (1941) показали у бактерий образование уксусной кислоты, меченной в углероде карбоксильной и метильной групп. Образование уксусной кислоты, повидимому, происходило по уравнению

$$C^{13}O_2 + 4H \rightarrow HC^{13}O_2 + C^{13}O_2 \rightarrow HC^{13}O.C^{13}OOH + 4H + C^{13}H_3.C^{13}OOH.$$

Факт образования этих соединений из углекислоты представляет принципиальный интерес, так как он выявляет сходство этой реакции с синтезом у аутотрофных бактерий.

Slade и др. (1942), используя янтарную кислоту, меченную в обоих карбоксилах, исследовали механизм образования уксусной кислоты из янтарной культурами Aerobacter, Sporogenes и B. coli. Как видно из приведенного уравнения, при этом образуются две частицы уксусной кислоты в углероде карбоксильной группы

$$C^{13}OOH.CH_2.CH_2.C^{13}OOH + 2H \rightleftarrows 2CH_3.C^{13}OOH.$$

Далее было показано, что из уксусной кислоты, меченной в углероде карбоксильной группы ($CH_3C^{13}OOH$), происходит образование янтарной кислоты, содержащей изотоп C^{13} только в углеродах карбоксильных групп. При использовании же уксусной кислоты, меченной в метильной и карбоксильной группах ($C^{13}H_3 . C^{13}OOH$), синтезировалась янтарная кислота, содержащая изотоп C^{13} во всех углеродных атомах.

Это указывает, что образование янтарной кислоты происходит путем прямой конденсации двух молекул уксусной кислоты. С помощью изотопного метода в опытах с Aerobacter, Sporogenes и B. coli значительно уточнен вопрос об обратимости процесса конденсации уксусной кислоты с образованием янтарной кислоты. При этом было показано, что вышеупомянутые микроорганизмы обратимо катализируют реакцию:

$$\begin{array}{lcl} C^{13}OOH & & C^{13}OOH \\ | & & | \\ CH_3 & \overset{-2H}{\rightleftarrows} & CH_2 \\ + & & | \\ CH_3 & & CH_2 \\ | & & | \\ C^{13}OOH & & C^{13}OOH. \end{array}$$

Образование янтарной кислоты путем прямой конденсации доказывается и тем, что при использовании уксусной кислоты, меченной в двух углеродах, происходило образование янтарной кислоты, меченной во всех углеродных атомах. Не менее существенным явилось доказательство, что гетеротрофные микроорганизмы группы спороносных Clostridium обладают способностью синтезировать уксусную кислоту путем утилизации углекислоты и молекулярного водорода (см. схему). Следует упомянуть,

что фиксация углекислоты имеет место также при образовании α-кетоглутаровой кислоты (Ajl и Werkman, 1948).

Это было показано с помощью бесклеточных энзимных препаратов из B. coli в присутствии янтарной кислоты и меченой углекислоты. При изотопном анализе образовавшейся α-кетоглутаровой кислоты меченый углерод был обнаружен в карбоксиле, находящемся рядом с карбонильной группой. При этом была показана обратимость этого процесса:

$$COOH.CH_2.CH_2.CO.C^{13}OOH \rightleftarrows COOH.CH_2.CH_2.COOH + C^{13}O_2$$

Установлено, что декарбоксилирование α-кетоглутаровой кислоты протекает с участием аденозинтрифосфорной кислоты.

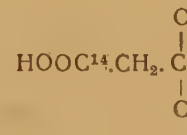
Биосинтез лимонной кислоты

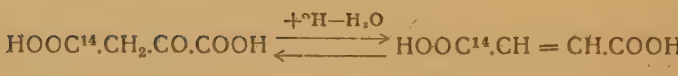
Прямая фиксация углекислоты при образовании более сложных органических кислот была доказана также с помощью изотопов углерода.

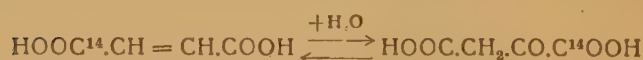
Foster и др. (1941) обнаружили меченый углерод при сбраживании глюкозы в присутствии меченой углекислоты в углеродных атомах карбоксильных групп лимонной кислоты. Образование лимонной кислоты, по их предположению, происходит путем восстановления углекислоты аналогично процессу, имеющему место при образовании метана (Barker и др., 1940).

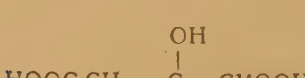
Martin и др. (1950), используя C^{14} в виде $BaC^{14}O_3$, показали, что Aspergillus niger содержит ферментные системы, катализирующие образование лимонной кислоты путем утилизации свободной углекислоты. На основании изотопного анализа продуктов распада лимонной кислоты они пришли к выводу, что путь фиксации углекислоты при образовании лимонной кислоты следующий:

$$C^{14}O_2 + CH_3COCOOH \rightarrow HOOC^{14}.CH_2CO.COOH$$
$$HOOC^{14}.CH_2.COCOOH + CH_3COOH \rightarrow$$









$$HOOC.CH_2.CO.C^{14}OOH + CH_3COOH$$

Изотопный метод позволил также внести ясность в вопрос о путях образования капроновой кислоты из этилового спирта и масляной кислоты культурами Clostridium klujveri.

Barker и др. (1946) с помощью меченого углерода в карбоксильной группе масляной кислоты изучали реакцию образования капроновой кислоты в присутствии этилового спирта

$$C_2H_5OH + CH_3.CH_2.CH_2.C^{14}OOH \rightarrow$$

$$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.COOH + H_2O.$$

При этом обнаружилось, что практически весь меченый углерод масляной кислоты находится в капроновой кислоте в β-положении. Это дало основание считать, что капроновая кислота образовалась путем конденсации масляной кислоты с активированной ацетильной группой при восстановлении за счет водорода, освобождающегося при окислении спирта, согласно приведенным уравнениям реакции:

1) $CH_3.CH_2.CH_2.C^{14}OOH + H_3C - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - OPO_3K_2 \rightleftarrows$

2) $CH_3.CH_2.CH_2.\overset{\overset{O}{\|}}{C} - O - P - O_3K_2 + CH_3.\overset{\overset{O}{\|}}{C}\underset{OH}{\diagdown} + 4H \rightarrow$

3) $CH_3.CH_2.CH_2.C^{14}H_2.CH_2.COOH + K_2HPO_4 + H_2O$

Наличие изотопа только в β-положении капроновой кислоты исключает предполагаемый ранее путь образования капроновой кислоты посредством присоединения активированной ацетильной группы к метильному углероду масляной кислоты. Местоположение C^{14} в капроновой кислоте ясно показывает, что при ее образовании происходит присоединение ацетильного остатка к карбонильной группе масляной кислоты. Образование капроновой кислоты путем конденсации двух молекул пропионовой не было обнаружено. Таким образом, синтез этой жирной кислоты Clostridium klujveri идет путем присоединения к масляной кислоте двууглеродистого остатка уксусной кислоты. Кроме того, исследовался путь образования валериановой кислоты (Stadtman и др., 1949) с помощью пропионовой кислоты, меченной в карбоксиле. Последняя добавлялась к культуральной среде Clostridium klujveri, содержащей немеченый этиловый спирт

$$CH_3.CH_2.C^*OOH + CH_3.CH_2OH \rightarrow CH_3.CH_2.C^*H_2.CH_2.COOH.$$

При этом из пропионовой кислоты в результате присоединения двухуглеродистого остатка этилового спирта образовалась валериановая кислота.

Авторы предполагают, что гептановая кислота образуется из валериановой кислоты и этанола аналогичным путем. Обнаруженная при исследовании приблизительно одна и та же удельная активность пропионовой, валериановой и гептановой кислот указывает на то, что одна молекула исходной жирной кислоты соответствует одной молекуле образованной кислоты с удлиненной на 2 углерода цепью. С помощью также изотопов углерода авторы установили, что пропионовая кислота легко переходит в пропионовый спирт. Приведенные данные указывают, что процесс утилизации и трансформации углекислоты является универсальным процессом, свойственным, как это было впервые установлено русским ученым Лебедевым (1921), гетеротрофным микроорганизмам, и что он имеет широкое распространение при образовании органических

кислот с различной длиной углеродной цепи. Имеющиеся экспериментальные данные показывают участие углекислоты в образовании метана, муравьиной, уксусной, пировиноградной, молочной, пропионовой, щавелевоуксусной, янтарной, фумаровой, яблочной, масляной, капроновой, лимонной, α-кетоглутаровой и других кислот (этот ряд субстратов может быть расширен, если учесть, что в животных тканях показана фиксация углекислоты в гликогене и др.).

Механизм фиксации углекислоты детально выяснен не для всех перечисленных органических молекул, однако для ряда соединений показано прямое внедрение углекислоты в углеродную цепочку. Эти данные сыграли выдающуюся роль в выяснении механизма превращения углеводов и жиров и установления взаимосвязи и корреляции между углеводным, жировым и белковым обменом. Кроме того, эти исследования отразили значение конечных продуктов обмена, в частности CO_2 в процессах ресинтеза структурных единиц клетки. Обнаружено также широкое распространение процесса фиксации углекислоты и его большая роль в образовании органических кислот у гетеротрофных организмов.

Фиксация азота

Большое внимание было уделено, особенно русскими исследователями, изучению процесса фиксации молекулярного азота азотфиксирующими бактериями. Этот процесс был открыт впервые Виноградским (1895) и детально исследован Костычевым, Русскальчик и Швецовой (1926), Буткевичем и Колесниковой (1941), Федоровым (1946, 1948, 1949), Гапоном (1947) и другими.

Применение изотопного метода значительно способствовало развитию этих работ, хотя надо отметить, что, несмотря на сравнительно значительный срок, протекший с момента применения тяжелого изотопа азота для исследования различных закономерностей обмена белка и его структурных единиц в живом организме, число исследований, проведенных по обмену бактерий с этим изотопом, чрезвычайно мало.

В известной мере использование изотопов азота для решения ряда вопросов азотистого обмена затормозили ошибочные исследования Nishina и др. (1941), якобы показавшие, что существует физический обмен между изотопами азота различных соединений. Эти авторы, добавляя радиоактивный изотоп азота N^{13} к среде с различными азотсодержащими соединениями и обнаружив через определенный промежуток времени N^{13} при изотопном анализе упомянутых соединений, сделали вывод о наличии физического обмена между свободным и связанным в органических веществах азотом и, следовательно, о непригодности изотопов азота для целей индикации.

Выводы Nishina явно находились в противоречии с данными Schoenheimer и др. (1941). Они повлекли за собой проверочные исследования Joris (1941), Burris и др. (1941), которые привели к доказательству ошибочности утверждений японских авторов.

Как было показано рядом работ, ошибочные выводы Nishina (1941) произошли в результате недостаточно тщательного отмывания исследуемых соединений от добавленного в среду изотопа. Burri и Miller (1941), используя тяжелый изотоп азота N^{15}, отчетливо показали полное отсутствие физического обмена между изотопом азота N^{14} и N^{15}, находящихся в органических соединениях и применили молекулярный азот N^{15} для решения весьма актуального вопроса о широте распространения процесса утилизации атмосферного азота среди бактерий.

Burris, Eppling и др. (1943) показали, что атмосферный азот интенсивно в основном используют только Azotobacter vinelandii.

При росте этого микроба на среде, свободной от азота, при наличии только в атмосфере азота, содержащего 28 атом % избытка N^{15}, после

33 часов в белковом азоте этих микробов можно было обнаружить 27,4 атом % избытка N^{15}.

Культуры Clostridium pasteurianum и др., росшие на бульоне в атмосфере азота, содержавшей те же 28 атом % избытка N^{15}, содержали в белковом азоте только 7,64 и 4,66 атом % избытка N^{15}. В этих условиях происходило значительное использование неизотопного азота среды, приведшего к разбавлению меченого азота.

В предшествовавшей работе Burris (1942) показал с помощью N^{15}, что Azotobacter vinelandii фиксирует молекулярный азот в различные аминокислоты белков ряда бактерий. Как видно из данных табл. 2, максимальный избыток N^{15} содержится в аминодикарбоновых кислотах, т. е. в глутаминовой и аспарагиновой кислотах. Эти данные дали основание считать, что у бактерий аммиак является промежуточным субстратом при фиксации атмосферного азота в структурные единицы белковой молекулы. Эти исследования блестяще подтвердили классические работы С. Н. Виноградского, впервые указавшего, что Clostridium pasteurianum и ряд других бактерий связывают молекулярный азот и что промежуточным продуктом при восстановлении молекулярного азота является аммиак, который трансформируется в азот белка. В связи с тем, что максимальное содержание избытка N^{15} обнаружено в аминодикарбоновых кислотах (Lardy, Burris, 1949), следует считать, что путь трансформации атмосферного азота лежит через аминодикарбоновые кислоты.

Исследованиями Burris и Wilson (1946) показана большая скорость процесса использования минерального азота Azotobacter vinelandii для построения белковой молекулы. Указанные авторы, используя меченый сернокислый аммоний, показали, что после трех минут экспозиции этих микроорганизмов в среде, содержащей меченый N^{15} аммоний, можно обнаружить изотоп N^{15} в различных аминокислотах белков бактерий, преимущественно в глутаминовой кислоте. Распределение изотопа N^{13} в аминокислотах было такое же, как это указано Burris (1942).

Wilson и др. (1947) с помощью N^{15} выяснили отношение Azotobacter vinelandii к различным источникам азота. При одновременном добавлении органических соединений азота, меченного N^{15}, и молекулярного азота, обогащенного этим же изотопом, вышеупомянутая культура в процессе роста использовала тот и другой азот, при этом с большей интенсивностью шло использование молекулярного азота из добавленных меченых органических соединений в виде аминокислот и амидов, с наибольшей интенсивностью использовался аспарагин. Характерно, что использование азота нитратов происходило только после предварительной, специальной адаптации этих бактерий к нему. Азот мочевины использовался с значительной интенсивностью.

Исследования способности бесклеточных препаратов Azotobacter vinelandii фиксировать молекулярный азот дали отрицательные результаты (Burris, 1942).

Таблица 2

Название вещества	Содержание N в мг	% общего N	Избыток N^{15} ат. %	% обнаруж. остатка N^{15}
Аргинин	109,0	26,60	0,185	20,20
Амидный азот . . .	20,4	4,98	0,325	6,63
Глутаминовая к-та .	16,7	4,07	0,500	8,35
Аспарагиновая к-та .	19,5	4,77	0,376	7,33
Гистидин	54,9	13,40	0,207	11,38
Фракция лизина . .	12,7	3,10	0,356	4,52

С помощью изотопов азота была показана широта распространения процесса фиксации молекулярного азота различными видами Clostridium (Rosenblum и Wilson, 1949), были исследованы 15 различных штаммов: Clostridium aceticum, acetobutilicum, acetourici beijekinckü, butyricum, butylicum, felsineum 195 Clujveri, lactoacetophilum, madisoni pasteurianum № 5, pectinovorum 73, perfringens, tetanomorphum, sporogenes. Из них только Clostridium sporogenes и perfringens не фиксировали азот, однако авторы считают, что нет еще достаточных оснований для вывода об отсутствии у них этой способности. Вероятно, не были созданы в эксперименте необходимые условия для роста этих бактерий. Более детальные исследования азотистого обмена с помощью изотопных индикаторов были проведены на дрожжах. Ряду авторов удалось осветить взаимосвязь между некоторыми аминокислотами в процессе роста дрожжей и выяснить предшественников отдельных углеродных атомов аминокислот. Кроме того, были исследованы особенности усвоения азота аммония некоторыми штаммами дрожжей.

Abrams и др. (1949) с помощью меченного азотом (N^{15}) аммония изучали утилизацию азота последнего в процессе синтеза белка, нуклеиновых кислот и пуринов дрожжами, выращиваемыми на различных питательных средах. Дрожжи, культивированные на углеродной среде, чрезвычайно слабо утилизировали азот аммония для построения белка и пуринов; культивируемые же на азотсодержащей среде с большой интенсивностью утилизировали аммоний N^{15} в указанные соединения. Кроме того, было показано, что меченные N^{15} дрожжи при росте и размножении в безазотистой среде не выделяют в нее азот в виде аммиака.

Используя дрожжевые клетки Torulopsis utilis в качестве модели для изучения судьбы карбоксильного углерода аланина и глицина, Ehrensvärd и др. (1947) добавляли к среде, на которой росли дрожжи, меченные C^{13} в карбоксильной группе упомянутые аминокислоты и исследовали на содержание изотопа углерода C^{13} ряд аминокислот белковых гидролизатов. При добавлении к среде аланина значительное содержание меченого углерода было обнаружено только в аланине белкового гидролизата.

В случае же добавления меченого глицина значительное обогащение изотопом C^{13} было в серине и пролине, что указывало на образование обеих аминокислот, так же как в животных тканях, из глицина.

Авторы предполагают, что механизм такого образования аминокислот связан с транскарбоксилированием, при котором углекислота может внедряться в пептидную цепочку. В последующих работах авторы Baddiley и др. (1950) в опытах с культурами дрожжей исследовали участие ацетильного остатка в построении аминокислот. С этой целью дрожжи, ранее адаптированные к уксусной кислоте, выращивались на среде, к которой добавлялась в качестве единственного источника углерода уксусная кислота, меченная C^{13} в метильной группе и C^{14} в карбоксильной группе. В процессе роста дрожжей улавливалась выдыхаемая углекислота. Аминокислоты, выделенные из гидролизатов дрожжей, выросших на такой среде, анализировались на наличие в них C^{13} и C^{14}, усвоенных дрожжами из добавленной к среде меченой уксусной кислоты.

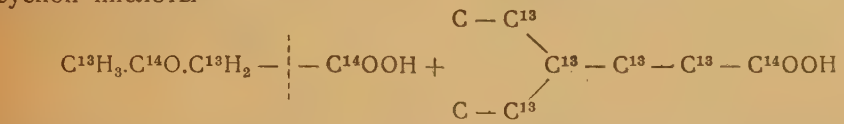
Исследования показали, что в течение 60 минут роста в дрожжи внедряется значительное количество меченых углеродов уксусной кислоты. Оказалось, что наибольшее количество углеродов уксусной кислоты включилось в аминодикарбоновые кислоты, причем метильный углерод C^{13} присутствовал в этих кислотах в относительно бо́льших количествах, чем карбоксильный C^{14}. Соотношение же C^{13} и C^{14} в основной и в нейтральной фракциях аминокислот показало, что в них преимущественно включилось C^{14}. Обнаруженное при этом количество карбоксильного углерода уксусной кислоты дает основание предположить, что он внедрился не только в карбоксильные группы этих аминокислот. Кроме того,

в опытах с культурами дрожжей, к которым была добавлена дважды меченная уксусная кислота ($C^{13}H_3.C^{14}OOH$), исследовалось распределение в тирозине усвоенных углеродов метильной и карбоксильной групп уксусной кислоты (Baddiley и др., 1950).

При этом был проведен изотопный анализ выделенных почти из каждого положения тирозина углеродов в виде отдельных порций углекислоты. В результате проведенных исследований было установлено, что максимальное количество C^{14} находится в карбоксильном углероде боковой цепи тирозина, а также в четырех углеродных атомах кольца. Судя по величине изотопа, можно было считать, что углерод карбоксильной группы уксусной кислоты непосредственно перешел в углерод упомянутых положений тирозина.

Углероды тирозина α, β, 1, 2 и 6 содержали преимущественно изотоп C^{13}, что указывало на их происхождение из метильной группы уксусной кислоты.

Данные, полученные в работе, указывают на то, что образование кольца тирозина связано с присоединением углеродных атомов к метильной и карбоксильной группам уксусной кислоты. Углероды боковой цепи этой аминокислоты происходят из карбоксильной и метильной групп уксусной кислоты



Из того, что α, β, 1, 2 и 6 углероды тирозина содержат преимущественно C^{13}, можно предположить, что предшественником их всех является углерод метильной группы уксусной кислоты, освобождающийся, повидимому, после декарбоксилирования последней. Вероятно, формирование бензольного кольца тирозина является особым случаем образования углеродной цепи, отличным от образования таковой в жирных кислотах и стеринах.

Обмен водорода у бактерий

Для исследования процессов обмена у бактерий применялись изотопы не только азота и углерода, но также тяжелый изотоп водорода — дейтерий. Farkas и др. (1947) с тяжелой водой исследовали процесс гидрирования фумаровой кислоты молекулярным водородом в культурах Proteus vulgaris; при этом был обнаружен энзиматический процесс обмена молекулярного водорода на водород воды.

Gieb и Bonhoeffer (1935—1936) наблюдали аналогичный процесс у B. coli. Weinmann и др. (1947) с помощью дейтерия был изучен механизм действия дегидрогеназы B. coli при образовании янтарной и фумаровой кислот; при этом было показано, что водород, связанный с углеродом, в этих кислотах обменивается под влиянием этого фермента на водород воды. Таким образом, было установлено, что при воздействии дегидрогеназы происходит обмен с водородом воды не только молекулярного водорода, но также водорода, связанного с углеродом органических соединений. Это катализирующее действие дегидрогеназ, обнаруженное сперва у бактерий, в дальнейшем было установлено и в животных тканях.

Заключение

В настоящей статье мы пытались отразить основные линии исследования обмена веществ микроорганизмов, успешному развитию которых в значительной мере способствовало применение метода изотопных индикаторов. Этим мы вынуждены были ограничить содержание данного обзора, однако он не исчерпывает многообразия вопросов, решаемых с помощью изотопной метки в микробиологии.

Изотопный метод был плодотворно применен не только при изучении обмена веществ у микробов, но также при выяснении природы вирусов, образования и механизма действия антибиотиков и при изучении закономерностей возникновения иммунитета. Уже в 1942 г. был использован тяжелый изотоп азота N^{15} для изучения образования антител. В дальнейшем вопросам иммунитета было посвящено значительное количество работ с применением различных изотопов. Обширность всех этих исследований исключает возможность осветить их в пределах одного обзора.

В настоящее время благодаря методу изотопных индикаторов накоплено много существенных фактов и пересмотрен ряд прежних представлений о превращении веществ в организме микробов.

В свете новых данных оказалась снятой ранее резко проводимая грань между обменом веществ у авто- и гетеротрофных организмов. Показано многократное использование конечных продуктов распада, расшифрованы стадии трансформации молекулярного азота в белковый и отражено разнообразие путей утилизации углекислоты в процессе образования амино- и жирных кислот и других. органических соединений.

Многообразие экспериментальных возможностей, открываемых изотопными индикаторами в биологии, дает основание с уверенностью считать, что в изучении обмена веществ микро- и макроорганизмов и в особенности химических процессов взаимодействия между ними, метод изотопных индикаторов сыграет решающую роль.

Научно-исследовательский институт
биологической химии АМН
Москва

Получено 14. IX. 1950 г.

ЛИТЕРАТУРА

Буткевич В. С., Колесникова Н. А. Об образовании аммиака при фиксации молекулярного азота азотобактером. ДАН, СССР, 33, 66, 1941.

Виноградский С. Н. Об усвоении свободного азота атмосферы микробами. Архив биол. наук, 3, 293, 1895.

Гапон Е. Н. Теория фиксации азота атмосферы микроорганизмами. ДАН, СССР 58, 249, 1947.

Гапон Е. Н. О механизме фиксации азота атмосферы азотобактером. Микробиология, XVI, 204, 1947.

Костычев С., Русскальчик А., Швецова О. Biochemische Untersuchungen über Azotobacter agile. Z. physiol. Chem., 154, 1, 1926.

Лебедев А. Ф. Об ассимиляции углерода сапрофитами. Изв. Донского гос. ун-та, кн. 1, 25, 1921.

Федоров М. В. Фиксация молекулярного азота азотобактером в присутствии поверхностно-активных и водоотнимающих веществ. Микробиология, XVIII, 299, 1949.

Федоров М. В. Химизм фиксации азота азотобактером. Микробиология XV, 6, 1946.

Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы. Монография Сельхозгиз, Москва, 1948.

Ajl S. J., Werkman C. H. Replacement of carbon dioxide in heterotrophic metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 34, 491, 1948.

Abrams R., Hammarsten E., Reichard P., Sperber E. Tracer studies of nitrogen assimilation in yeast. J. Gen. Physiol., 32, 217, 1949.

Baddiley J., Ehrensvard G., Klein E., Reio Z., Saluste E. Acetic acid metabolism in Torulopsis utilis. II. Mechanism connection between acetic acid and tyrosine and a method of degradation of the phenolic ring structure in thyrosine. J. Biol. Chem., 183, 177, 1950.

Baddiley J., Ehrensvärd G., Johnsson R., Reio L., Salusta E., Stjerholm R. Acetic acid metabolism in Torulopsis utilis. I. The constitution of Torulopsis yeast in $C^{13}H_3$ $C^{14}OOH$ as the single carbon source. J. Biol. Chem., 183, 771, 1950.

Barker H. A., Berk I. V., The fermentative decomposition of purius by Clostridium aceti urici and Clostridium cylindrosporum. J. Biol. Chem., 147, 3, 1943.

Barker H. A., Kamen M. D., Boristein B. T. The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by Clostridium Klujveri. Proc. Net. Acad. Sci. U. S., 31, 373, 1946.

Barker H. A., Kamen M. D. Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic acid by Clostridium thermoaceticum. Proc. Nat. Acad. Sci., 31, 219, 1945.
Barker H. A., Ruben S., Kamen M. D. Reaction of radioactive carbon dioxide by methaneproducting bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 26, 426, 1940.
Barker H. A., Volgani B. E., Carbon B. P. Tracer experiments on the mechanism of glycine fermentation by diplococcus glycinophilus. J. Biol. Chem., 173, 803, 1948.
Burris R. H. Distribution of isotopic nitrogen in azotobacter vinelandii. J. Biol. Chem., 143, 509, 1942.
Burris R. H., Eppling F. J., Wahlin H. E., Wilson P. W. Detection of nitrogen fixation with isotopic nitrogen. J. Biol. Chem., 148, 349, 1943.
Burris R. H., Miller C. E. Application on N^{15} to study of biological nitrogen fixation. Science, 93, 114, 1941.
Burris R. H., Wilson P. W. Comparison of the metabolism of ammonia and molecular nitrogen in azotobacter. J. Biol. Chem., 165, 595, 1946.
Ehrensvärd G., Sperbes E., Saluste E., Reio L., Stjernholm R. Metabolic connection between proline and glycine in the amino acid utilization of Torulopsis utilis. J. Biol. Chem., 169, 759, 1947.
Farkas L., Schneidmesser S. The hydrogenation of fumaric acid by heavy hydrogen in the presence of B. coli. J. Biol. Chem., 167, 807, 1947.
Foster J. W., Carson S. F., Ruben S., Kamen M. D. Radioactive carbon as a fracer in the synthesis of propionic acid from carbon dioxide by the propionic acid bacteria. Science, 92, 433, 1940; Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 27, 590, 1941.
Gieb K. A., Bonhoeffer K. F. Über den Einbau von schweren Wasserstoff in wachsende Organismen. Z. physik. Chem., A 175, 459, 1936.
Joris G. G. The exchange reaction between gaseous and combined nitrogen. J. Chem. Phys., 9, 775, 1941.
Krampitz L. O., Werkman C. H. Enzymatic fixation of carbon dioxide in oxalacetate. J. Biol. Chem., 147, 243, 1943; Biochem. J., 35, 595, 1941.
Lardy H. A., Potter R. L., Burris R. H. Metabolic function of biotin. I. The rôle of biotin in bicarbonate utilization by Lactobacillus arabinosus studied with C^{14}. J. Biol. Chem., 179, 721, 1949.
Martin S. M., Wilson P. W., Burris R. H. Citric acid formation from $C^{14}O_2$ by Aspergillus niger. Arch. Biochem., 26, 103, 1950.
Nishina J., Jimori T., Kibo H., Nakajama H., цит. по Burris R. H. and Wilson P. W. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Biochem., XIV, 685, 1945. J. Chem. Phys., 4, 571, 1941.
Rosenblum E. D., Wilson P. W. Fixation of isotopic nitrogen by Clostridium. J. Bact., 57, 413, 1949.
Schoenheimer R. The dynamic state of body constitutients. 1942.
Slade H. D., Wood H. G., Nier A. O., Heningway A., Werkman C. H. Assimilation of heavy carbon dioxide by heterotrophic bacteria. J. Biol. Chem., 143, 133, 1942
Stadtman E. R., Stadtman T. C., Barker H. A. Tracer experiments on the mechanism of synthesis of valeric and caproic acids by Clostridium klujveri. J. Biol. Chem., 178, 677, 1949.
Weinmann E. O., Morchouse M. G., Winzler R. J. The effect of succinic dehydrogenase an deuterium-labeled succinic acid in the absence of hydrogen acceptors. J. Biol. Chem., 168, 717, 1947.
Wilson P. W., Barris R. H. The mechanism of biological nitrogen fixation. Bacteriological Review. II, 41, 1947.
Wood G. H., Werkman C. H. The utilization of CO_2 in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. Biochem. J., 30, 48, 1936.
Wood G. H., Werkman C. H. Mechanism of glulcose dissimilation by the propionic acid bacteria. Biochem. J., 30, 618, 1936.
Wood H. G., Werkman C. H. The relationship of bacterial utilization of CO_2 to succinic acid formation. Biochem. J., 34, 129, 1940.
Wood H. G., Werkman C. H., Heningway A., Nier A. O. Heavy carbon as a tracer in bacterial fixation of carbon dioxide. J. Biol. Chem., 135, 789, 1940.
Wood H. G., Werkman C. H., Heningway A., Nier A. O. Heavy carbon as a traces in heterotrophic CO_2 assimilation. J. Biol. Chem., 139, 365, 1941.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Schatz A., Saward K. and Pinter J. **The ability of soil microorganisms to decompose steroids. (Способность почвенных микроорганизмов разрушать стерины).** J. Bact., v. 58, No. 2, pp. 117—125, 1949.

По данным Турифита разрушение холестерина в почве происходит в основном под воздействием актиномицетов, среди которых Nocardia erythropolis является особенно активным. Исследования, проведенные авторами по той же методике, не подтвердили этих выводов.

С обогатительной среды было выделено 22 культуры бактерий, различающихся по характеру колоний. Для засева употреблялись почва, торф, компост, а также навоз.

Все бактерии хорошо развивались на среде следующего состава: холестерин — 0,06—0,1%, KH_2PO_4 — 0,1%; NH_4NO_3 — 0,2%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,02%; Fe — 1 мг; Cu — 0,05 мг; B — 0,02 мг; Co — 0,01 мг; Ca — 0,001 мг; Mn — 0,0001 мг; Mo — 0,01 мг; Zn — 0,02 мг на 1 литр дестиллированной воды pH — 6,2.

Из навоза и компоста была получена культура (№ 5) грамотрицательных палочковидных бактерий, очень энергично разрушающих холестерин.

При изучении влияния холестерина, эргостерина и др. на микроорганизмы обнаружилось, что холестерин и его соединения в противоположность эргостерину не оказывают вредного действия на большинство бактерий, актиномицетов и грибов.

На основании сравнительных исследований авторы приходят к выводу о наличии у определенных групп грамотрицательных бактерий большей способности к разрушению стеринов, чем у актиномицетов.

В. Успенский

Tjia J., Wassink E. and Wintermans J. **Phosphate exchanges in purple sulfur bacteria in connection with photosynthesis. (Изучение фосфорного обмена пурпурных серобактерий в связи с фотосинтезом).** Proc. K. Ned. Acad. Wet., v. 52, pp. 412—422, 1949.

Авторы изучали изменения концентрации PO'''_4 в суспензии Chromatium D при продувании через нее определенных газовых смесей $N_2 + CO_2$; $N_2 + H_2$ на свету и в темноте. Для приготовления суспензии применялся боратный буфер (pH = 8) с содержанием PO'''_4 8 γ/мл. Суспензия помещалась в цилиндрическую стеклянную воронку. Трубка в дне воронки заполнялась плотным слоем фильтровальной бумаги. Через суспензию продувались следующие газовые смеси: $N_2 + 30\% H_2$, $N_2 + 5\% CO_2$. Через трубку в дне воронки периодически отбирались пробы среды и в них определялось содержание PO'''_4.

Опыты показали, что в темноте PO'''_4 выделяется клетками в среду, причем выделение идет с одинаковой скоростью и в атмосфере $N_2 + CO_2$ и в атм. $N_2 + H_2$. При переносе суспензии на свет наблюдается заметное потребление PO'''_4 клетками из среды в атм. $N_2 + H_2$ и значительно меньшее потребление в атм. $N_2 + CO_2$. Перенесение суспензии со света в темноту с заменой газовой смеси $N_2 + H_2$ на $N_2 + CO_2$ вызывает значительно большее выделение PO'''_4, чем без такой замены. Изменение концентрации PO'''_4 при этом достигает 10% от общего фосфора бактериальных тел. По мнению авторов результаты их опытов находятся в прямом соответствии с данными Vogler о сопряженном с окислением серы синтезе клетками Thiolacillus thiooxidans, богатых энергией фосфорных соединений, если принять, что вместо энергии окисления серы Chromatium использует для синтеза этих соединений лучистую энергию. Кроме того, авторы считают, что их данные подтверждают предположение о способности Chromatium фиксировать световую энергию в виде макроэргических фосфорных соединений и использовать ее для ассимиляции CO_2 в темноте, а также на нужды основного обмена.

Ю. Сорокин

Hervey R. J. **Effect of chromium on the growth of unicellular Chlorophyceae and diatoms. (Действие хрома на рост одноклеточных зеленых и диатомовых водорослей).** Bot. Gaz. v. 111, No. 1, pp. 1—11, 1949.

Влияние хрома на развитие различных микроорганизмов до сих пор не достаточно выяснено. По одним данным, присутствие хрома в питательной среде даже в небольших количествах 0,1 мг/л оказывает токсическое действие, по другим — хром

является необходимым элементом питательной среды, стимулирующим энзиматические процессы у некоторых организмов.

Опыты по выяснению влияния хрома на рост и развитие организмов авторы проводили с 3 группами одноклеточных водорослей: хлорококковые (Chlorella variegatus, Chlorococcum humicola, Scenedesmus obliquus), евгленовые (Lopocinelus stenii N 46), диатомовые (N 26 и 47) на 2 питательных средах. 1-я являлась синтетической и содержала следующие вещества в мг/л: KNO_3—400, K_2HPO_4—50; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—250; $CaCl_2 2H_2O$—20; K_2CO_3—500; $MnSO_4 4H_2O$—15; $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$—20; $NaSiO_3 9H_2O$—500; KJ—10, на 1 л дестиллированной воды. 2-я среда приготовлялась смешением 600 мл 1-й среды с 400 мл почвенной вытяжки на речной воде.

Опыты ставились в пробирках (стекло пирекс). Определение прироста водорослей производилось на-глаз через 15,33 и 56 дней. Хром добавлялся в виде Cr_2O_7 в перерасчете на Cr от 0,0001 до 32 мг/л. Контролем служила основная среда без хрома.

Хром в концентрациях 0,001—0,32 мг/л стимулирует рост Chlorococcum. Для других видов водорослей стимуляция была незначительной, а для Chlorella variegatus она не проявлялась совсем.

Диатомовые водоросли наиболее чувствительны к хрому. Предел выносливости их в 1-й среде равняется 0,032 мг/л Cr. Их рост полностью тормозится при концентрации 0,32 мг/л Cr. Во 2-й среде эти культуры хорошо растут при концентрации 0,32 мг/л Cr; полная же задержка развития наступает на этой среде при 1,6 мг/л Cr. Евгленевые водоросли менее чувствительны к хрому. Их рост на 1-й среде приостанавливается при концентрации 0,32—1,6 мг/л Cr. Во 2-й среде они выдерживают более высокие концентрации хрома.

Хлорококковые водоросли сравнительно стойки в отношении хрома: переносят концентрацию хрома 6,4 мг/л, растут при концентрации хрома до 3,2 мг/л.

Уменьшение токсичности хрома на среде с почвенной вытяжкой предположительно объясняется присутствием как органических, так и неорганических веществ, способных сорбировать или осаждать хром.

По мнению авторов, частые неудачи культивирования водорослей на синтетической среде происходят из-за присутствия Cr_2O_7, который в небольших количествах попадает в раствор после обработки стекла перед его употреблением. Было найдено, что при обработке стекла Cr_2O_7 последний хорошо сорбируется стеклом и трудно отмывается. После 10-кратного споласкивания содержание Cr_2O_7 в растворе равняется 0,1—0,2 мг, что может влиять на развитие водорослей.

В. Успенская

Gordon R. E. and Smith N. **Aerobic sporeforming bacteria capable of growth at high temperatures (Аэробные спороносные бактерии, способные расти при высокой температуре).** J. Bact., v. 58, No. 3, pp. 327—341, 1949.

Для изучения аэробных спороносных бактерий, растущих при высоких температурах, авторы использовали 216 культур, полученных из различных лабораторий. Из этого большого материала были отобраны 33 расы для детального исследования. Кроме того, сами авторы выделили ряд культур из пищевых продуктов, почвы и силоса. Выделение термофильных аэробных культур производилось двумя методами: 1) бралось небольшое количество молока, сыра, почвы и т. д. в пробирку, разбавлялось стерильным бульоном, подогретым до 85°, и выдерживалось в нем 5—10 минут. Затем пробирки быстро охлаждались до 57° и при этой температуре сохранялись в течение ночи, после чего культуры пересевались на питательный агар и выдерживались в термостате при 45—57° 1—2 дня. 2) Суспензия из бактерий вносилась в мясной бульон. Последний нагревался 5 минут до 100°, при этом погибали все вегетативные формы. После 1-го прогрева суспензия в мясном бульоне выдерживалась при 55°, 60° и 65° в течение 24—48 часов, а затем пересевалась для проверки на среду с глюкозой или агар с крахмалом вместо обычного питательного агара. Наблюдался гидролиз крахмала и изменение pH в питательной среде с глюкозой.

Из присланных культур 39% принадлежали к термофильным видам или видам, которые хорошо растут при ровной невысокой температуре, и только несколько культур принадлежали к мезофильным видам Bac. subtilis и Bac. circulans. 44 культуры, подвергшиеся подробному изучению, можно было разделить на две группы: 1) Bac. stearothermophilus Donk. и 2) Bac. coagulans Hammer.

Все расы Bac. stearothermophilus росли при 65°, причем половина из них развились и при 70°. Bac. coagulans же обнаружили плохой рост при 65°, Bac. subtilis, Bac. brevis и Bac. circulans при 60°; Bac. pumilus, и Bac. cereus — при 55 и 50°. За исключением Bac. stearothermophilus и Bac. coagulans все культуры хорошо росли при 28°.

Максимальная температура роста широко варьировала среди рас и потому ею нельзя было воспользоваться для деления на виды, за исключением Bac. stearothermophilus.

Авторы приводят подробное морфологическое описание Bac. stearothermophilus Donk. и Bac. coagulans Hammer, указывая, что эти культуры могут быть выделены в два вида по следующим признакам: Bac. stearothermophilus растет при 65° и разжижает довольно сильно желатину и совсем не растет на кислом агаре (pH = 5,0).

pH на бульоне с глюкозой через 7 дней равен 5,5—5,0. Bac. coagulans не растет при 65°, слабо разжижает желатину, слабо и хорошо растет на кислом агаре (pH = 5,), pH на бульоне с глюкозой через 7 дней равен 4,4—4,8.

В. Успенская

ZoBell C. E. and Jonson F. H. **The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. (Влияние гидростатического давления на выживаемость и рост морских и наземных бактерий).** J. Bact. v. 5, pp. 179—189, 1949.

Цель работы заключалась в выяснении влияния высокого гидростатического давления на бактерий в связи с их способностью существовать в глубоководных илах и нефтяных месторождениях, где давление достигает значительных величин. Методика опытов была следующая: чистые культуры микроорганизмов выращивались на бульоне до фазы логарифмического роста, после чего они наливались доверху в стерильные пробирки. Пробирки закрывались специальными каучуковыми пробками (способными передавать давление внешней среды), помещались в стальную камеру и заливались водой. В камере создавалось требуемое давление и определенная температура. Контрольные пробирки инкубировались в такой же камере при атмосферном давлении. Скорость размножения учитывалась по степени помутнения и чашечным методом.

Опыты показали, что почвенные бактерии (роды Bacillus, Clostridium, Mycobacterium, Micrococcus) и дрожжи погибают при инкубации в течение 48 часов под давлением 600 атм. при температуре 30°. Давление 400 атм при той же температуре значительно снижает скорость размножения указанных выше бактерий и действует губительно на дрожжи. Угнетающий эффект высокого гидростатического давления уменьшается при повышении температуры выше оптимума (до 40°). Бактерии, выделенные из поверхностных вод океана, реагировали на повышенное давление таким же образом, как и почвенные. Бактерии — обитатели глубоководных илов (глубина около 6000 м) нормально размножались под давлением 600 атм. На рост смешанной микрофлоры из глубоководного ила давление 600 атм. оказывает стимулирующее влияние. «Барофильность» глубинной микрофлоры объясняется ее приспособленностью к высокому давлению. Уменьшение угнетающего влияния давления на наземные формы при повышении температуры выше оптимума, по мнению авторов, является следствием ускорения реакций обмена, которые тормозятся повышенным давлением.

Ю. Сорокин

Capps B. F., Hobbs N. L. and Fox S. H. **A method for the microbiological assay of vitamin B_{12}. (Метод микробиологического определения витамина B_{12}).** J. Biol. Chem., v. 178, No. 1, pp. 516—517, 1949.

Как известно, Lactobacillus lactis Dorner (ATCC 8000), используемый для микробиологического определения витамина B_{12}, должен выращиваться со специальными предосторожностями в целях предотвращения диссоциации, тогда как Lactobacillus leichmannii, нуждающийся в тех же ростовых веществах, что и Lactobacillus lactis Dorner, склонен к диссоциации лишь в незначительной мере.

Авторы разработали метод определения витамина B_{12} с применением в качестве тест-организма Lactobacillus leichmannii (ATCC 4797).

Стандартные пробы витамина B_{12} и опытные пробы доводятся дестиллированной водой до концентрации около 0,02 γ/мл. Наиболее точные результаты получаются при содержании в каждой пробирке от 0,01 до 0,10 γ. В пробирках, содержащих лишь дестиллированную воду и основную среду, роста не наблюдается. После 18-часовой инкубации бактерий при 37° содержание витамина определяется по мутности среды.

Состав основной среды двойной концентрации таков: 12 г безвитаминного продукта, содержащего необходимый набор аминокислот (например гидролизаты казеина), 40 г декстрозы, 20 г уксуснокислого натрия, 0,2 г *l*-цистина, 0,2 г *dl*-триптофана, 0,02 г аденина, 0,02 гуанина, 0,02 г урацила, 1 мг ксантина, 2 мг солянокислого тиамина, 0,2 мг кальциевой соли *d*-пантотеновой кислоты, 0,1 мг фолевой кислоты, 0,01 мг биотина, 0,2 мг *p*-аминобензойной кислоты, 200 мг Tween 80, 1 мг двузамещенного фосфата калия, 1 мг однозамещенного фосфата калия, 0,4 г сернокислого магния, 0,02 г хлористого натрия, 0,02 г закисного сернокислого железа, 0,02 г сернокислого марганца и воды до 1 л. Перед употреблением среда доводится до pH = 6,8.

Е. Грищенко

Lardy H. A., Potter R. L. and Burris R. H. **Methabolic functions of biotin. I. The role of biotin in bicarbonate utilisation by Lactobacillus arabinosus studied with C^{14}. (Функции биотина в метаболизме. I. Изучение роли биотина в усвоении CO_2 Lactobacillus arabinosus с применением C^{14}).** J. Biol. Chem., v. 179, pp. 721—732, 1949.

На многих микроорганизмах было показано существование связи метаболизма щавелевоуксусной и аспарагиновой кислот, с одной стороны, и биотина — с другой. Считалось, что этот факт может служить косвенным доказательством участия биотина

в качестве катализатора в обратимом карбоксилировании пировиноградной кислоты (по реакции Вуда — Веркмана). В настоящей работе эта точка зрения подверглась прямой проверке с применением радиоактивного изотопа углерода. Авторы провели сравнительное изучение скорости фиксации $C^{14}O_2$ клетками Lactobacillus arabinosus, полученными из различных культур. Одни культуры выращивались на среде, в которой биотин был заменен аспарагиновой кислотой, другие, контрольные, на среде с добавлением биотина. Опыты со взвесями клеток, которые получались центрифугированием соответствующих культур, проводились в варбурговских сосудиках. Бикарбонат, содержащий радиоактивный изотоп углерода C^{14}, добавлялся из бокового отростка сосудика.

После определенного срока инкубации взвесь клеток центрифугировалась и осадок «промывался» током CO_2. Фиксация $C^{14}O_2$ бактериальными телами определялась в счетнике. Опыты показали, что клетки Lactobacillus arabinosus, выращенные в отсутствие биотина, почти нацело теряют способность фиксировать $C^{14}O_2$. Они фиксировали $C^{14}O_2$ в 50 раз медленнее, чем контрольные.

Две трети $C^{14}O_2$ фиксированной клетками, выращенными в присутствии биотина (контроль), обнаруживается в аспарагиновой кислоте, входящей в состав бактериальных тел.

Фиксация $C^{14}O_2$ контрольными взвесями сильно тормозилась при добавлении в сосудики аспарагиновой кислоты. Этот факт трактуется авторами как возможность косвенного участия биотина в процессе фиксации CO_2 — путем ускорения синтеза белков. По их мнению, ускоренный синтез белков будет способствовать потреблению аспарагиновой кислоты и сдвинет направление приведенных ниже реакций вправо, а недостаток биотина — влево:

$$+ NH_3 + H_2 \rightleftarrows HOOC - CH_3 - CHNH_2 - COOH \rightleftarrows \text{белок}$$

$$CH_3 - CO - COOH + CO_2 \rightleftarrows HOOC - CH_2 - CO - COOH +$$

Ю. Сорокин

Olson B. H. and Marvin J. **Factors producing high yeast yields in synthetic media. Факторы, повышающие урожай дрожжей на синтетической среде.** J. Bact. v. 57, No. 2, pp. 235—246, 1949.

Несмотря на давность изучения значения отдельных питательных веществ для развития дрожжей, до сих пор еще, однако, не удалось обеспечить все условия для хорошего их роста на синтетической среде. Настоящее исследование является попыткой решения этого вопроса.

Авторами создана синтетическая питательная среда, на которой Saccharomyces cerevisiae y-30 давала 5,33 г сухого вещества на 1 л среды, что соответствует интенсивности развития на естественных средах. Синтетическая среда, кроме обычных минеральных веществ, как $NH_4H_2PO_4$ — 6 г, KH_2PO_4 — 0,2 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,25 г. и цитрат натрия — 1 г в качестве буфера на 1 л воды, должна содержать в качестве источника углерода 10 г глюкозы и 2,5 г — аспарагина.

В состав среды должны также входить: биотин 20 микрограмм, кальций пантотенат — 0,5 мг, инозитол — 10 мг, пиридоксин — 1 мг, тиамин — 4 мг и микроэлементы Fe — 75; Zn — 200 и Cu — 12—15 микрограмм на 1 л среды.

Начальное pH не ниже 5,0. Добавка солодового и кукурузного экстракта излишня.

В опытах с различной скоростью аэрации при большем поступлении кислорода чем 1 миллимоль на 1 л среды в минуту, наблюдалось снижение развития дрожжей. Отсюда авторы предполагают существование оптимума аэрации для дрожжей.

В процессе работы было изучено действие 21 аминокислот на рост дрожжей. По своему действию аминокислоты можно разделить на 3 группы: 1) индифферентную, 2) оказываемую слабое и 3) сильное стимулирующее влияние. К первой относились: глицин, лейцин, глютаминовая к-та, цистин и тирозин; ко второй: лизин, аргинин, орнитин, триптофан, метионин и пролин; к третьей — аланин, валин, серин и фенилаланин. Между прочим, только серин и аланин могли полностью заменить аспарагин.

В. Успенская

Chany W. S. and Peterson W. H. **Factors affecting the biotin content of yeast. (Факторы, действующие на содержание биотина у дрожжей).** J. Bact. v. 58, No. 1, pp. 33—45, 1949.

Отношение дрожжей, особенно типа Saccharomyces, к биотину до сих пор мало изучено. В то же время известно, что содержание биотина у целого ряда дрожжей достигает от 0,6 до 1,8 мг на 1 г сухого вещества. В настоящей работе приводятся данные по определению способности к образованию биотина у различных типов дрожжей. Было взято 27 культур дрожжей: Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae 53, Endomyces magnusii 836, Hansenula anomala var. spherica 748, Torulopsis utilis 2 и т. д.

Синтетическая среда для посева и брожения применялась одна и та же. Для посева к ней добавлялось 5% свекловичной мелассы, 2% солодового экстракта (Дифко), 0,75% кукурузного экстракта и 0,1% $(NH_4)_2HPO_4$. Для исследования бро-

жения вносилась свекловичная или тростниковая меласса из расчета 1% редуцирующего сахара, 0,1% $(NH_4)_2HPO_4$ и 2% кукурузного раствора, приготовленного следующим образом: кукурузный экстракт разбавлялся в отношении 1 : 3, кипятился 30 минут и фильтровался.

Активность дрожжей выражалась в процентах сброженного сахара. Биотин учитывался: общий, свободный, растворимый, нерастворимый. Кроме того, учитывался биотин в среде, в которой происходило брожение.

Опыты, поставленные для определения активности и содержания биотина с 27 расами дрожжей на среде со свекловичной и тростниковой мелассой, дали следующие результаты: 17 рас (например Debaryomyces globosus, Hansenula saturnus, Saccharomyces cerevisiae 53; Saccharomyces cerevisiae y-30 и т. д.) дали активность 50% и больше (на сухой вес) в пересчете на сброженный сахар. Пять рас (Gandida albicans, Debaryomyces matruchoti, Hansenula anomala var. spherica 778 и т. д.) дали активность 70% и больше. Пять других рас (Pichia alcoholophila, Mycoderma cerevisiae, Gandida krusei и т. д.) росли слабо, активность на среде со свекловичной мелассой равнялась 11—21%, с тростниковой 23—41%. Активность на синтетической среде не превышала 50%. Повышение активности больше чем на 50% авторы относят за счет утилизации дрожжами углерода не только из сахара, но и кукурузного экстракта.

Накопление биотина изучалось для 22 рас дрожжей. Содержание биотина в дрожжах, росших на тростниковой мелассе, было обычно выше, чем на среде со свекловичной мелассой. Тростниковая меласса содержала биотина 1,4 мг, а свекловичная же только 0,1 мг на 1 г. Накопление биотина у различных рас дрожжей сильно варьирует. Так, содержание биотина колебалось от 0,23 (Debaryomyces matruchoti) до 5,27 мг на 1 г и от 1,1 (Endomycopsis fibuliger) до 7,6 мг на 1 г.

Опыты, поставленные с 7 расами дрожжей с добавлением биотина к различным средам, показали, что Saccharomyces cerevisiae 53 требует для своего роста биотин и потребляет его в большом количестве, около 21,4 мг на 1 г на среде со свекловичной мелассой и 42,2 мг на 1 г на синтетической среде. Другие расы дрожжей, например Endomyces magnusii, также требуют для своего роста биотин, но не потребляют его в значительном количестве из среды.

Таким образом, одни дрожжи потребляют биотин из среды, другие же синтезируют его сами. Так, Torulopsis utilis, Hansenula anomala, способные к синтезу биотина (около 1,6 мг), как правило, не потребляют его много из среды.

В. Успенская

Bultin K. R., Adams M. E. and Thomas M. **The morphology of sulfate-reducing bacteria. Морфология бактерий, восстанавливающих сульфаты.** J. Gen. Microb., v. 3, 1949.

Авторами изучался плеоморфизм мезофильных штаммов сульфат редуцирующих бактерий. Эти бактерии на лактатносульфатной среде с добавлением дрожжевого экстракта имеют вид очень подвижных вибрионов с одним полярным жгутом. Если исключить из состава этой среды дрожжевой экстракт и добавить в нее 3% Na_2SO_3, то вместо вибрионов появляются в большом количестве спириллы. Штаммы неподвижных сульфат редуцирующих бактерий образуют на такой измененной среде нити и спириллы до 100 μ длиной. Добавление дрожжевого экстракта уменьшает влияние сульфита на морфологию этих бактерий.

При культивировании на среде, не содержащей солей железа, через 8 дней наблюдалось образование кокков и коротких палочек.

Клетки термофильных штаммов толще, прямее и длинее мезоофильных форм. Электронная микрофотография показывает, что эти клетки имеют по нескольку жгутиков.

Авторами было изучено превращение мезофильных форм клеток в термофильные формы при повышении температуры культивирования. Критическая температура этого превращения равна 40—45°, что соответствует данным Старки.

Ю. Сорокин

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

И. А. Макринов **Основы биологической мочки волокнистых растений.** Издание Академии Наук СССР, Москва — Ленинград, 1949.

Книга, по словам автора, «предназначена для исследовательских институтов текстильной промышленности, для практических работников и как пособие для студентов Книга имеет в виду восполнить отсутствие в русской литературе руководства по мочке, объединить работников в этой области и ликвидировать несогласованность в приемах производства».

Из вводной главы, в которой слишком кратко излагается история мочки волокнистых растений, мы узнаем, что с введением предложенного автором аэробного способа мочки начинается третий период в истории вопроса, что аэробный способ разрешил проблему мочки с теоретической и производственной стороны и что мочка впервые получает научно-теоретическое обоснование. Далее говорится, что современное учение (т. е. «учение» автора) о биологической мочке покоится на представлении о «нормальном» бактериальном процессе, осуществляемом аэробным способом; при всяких видоизменениях аэробный способ брожения должен сохранять особенности правильно протекающего, совершенного по биохимизму процесса. Представление о нормальном бактериальном процессе является, согласно автору, достижением, значение которого трудно переоценить (стр. 11—12).

Так оценивает свои работы автор.

Прежде чем перейти к критическому разбору книги, коснемся кратко ее содержания

Книга состоит из четырех глав (анаэробная мочка, метод повторных мочек, аэробный способ мочки, главнейшие специфические микробы — возбудители брожения пектиновых веществ), составляющих общую часть книги, и шести глав специальной части, посвященных мочке отдельных растений.

Большое место уделено вопросам технологии; в книге приводятся данные по анатомическому строению волокнистых растений. В книге отсутствуют, однако, сведения о ферментах, разлагающих пектин, и данные о строении пектина.

Первая глава книги посвящена анаэробной мочке. Знакомя с анаэробным способом мочки волокнистых растений, автор, казалось бы, должен был постараться дать четкий ответ на вопрос о возбудителях мочки, о сопутствующей или побочной микрофлоре, о роли обеих групп микрофлоры в процессе мочки и о взаимоотношениях между ними, о биохимических особенностях этого способа мочки, об изменениях, вызываемых в составе микрофлоры химическими и физическими факторами среды, и о возможности воздействия на микрофлору с целью управления процессом мочки. Основной материал по этим вопросам следовало сконцентрировать в первой главе, чтобы осветить их исчерпывающим образом и дать читателю четкое представление об интересующем его предмете. Вместо этого, в первой главе мы находим отрывочное изложение различных вопросов, причем здесь, как во введении, главный упор направлен на то, чтобы доказать, что анаэробный способ мочки «дефективен по своей природе».

Изложение вопроса о поведении микрофлоры мочки в течение первых суток нельзя считать безупречным. О поведении возбудителей мочки на двух следующих одна за другой страницах (14 и 15) высказывается два противоречивых мнения.

На составе и роли побочной или сопутствующей микрофлоры автор останавливается в первой, третьей и пятой главах (стр. 15, 88, 97), вместо того, чтобы в одном месте указать, из каких микробов состоит эта микрофлора и какую роль она может играть.

В нескольких местах книги автор настаивает на том, что по мере повторений мочек происходит отбор наиболее приспособленных к данным условиям представителей банальной микрофлоры.

После того, что автор говорил «о постоянно специализирующейся и ограничивающейся сравнительно небольшим числом видов» побочной микрофлоре (стр. 15) и об отборе этой микрофлоры, странно звучат следующие строки (стр. 96): «Помимо описанной микрофлоры самопроизвольной мочки на стеблях и жидкости оседает множество посторонних микробов. Эта привходящая посторонняя микрофлора меняется не только от одной мочки к другой, но и в течение даже одной мочки. Все это создает сложную микробиологическую картину и не дает возможности определить подлинную постоянную микрофлору мочки, которая всегда в ней присутствует и ведет процесс мочки».

Однако в отношении микрофлоры самопроизвольной мочки белорусского льна (отдельные формы которой были выделены при посредстве повторных мочек в среде, кислотность которой доходила до pH = 4,0—4,2) дело обстоит иначе. «Эта микрофлора,— говорит автор,— очевидно и есть настоящая микрофлора самопроизвольной мочки белорусского льна, она представляет собой не случайную, механическую, а симбиотическую смесь микробов, находящихся в определенных отношениях друг к другу, обусловливаемых биохимическими свойствами отдельных компонентов этой группы микробов» (стр. 101).

Мы не уверены, что своим методом выделения автор обнаружил настоящую микрофлору самопроизвольной мочки белорусского льна, потому что низкий pH не может считаться благоприятным для жизнедеятельности всех представителей самопроизвольной мочки; мы хотим вместе с тем отметить, что таким образом сам автор признает, что и в условиях анаэробиоза возможны такие отношения, которые он считает характерными для «нормального» бактериального процесса, которого мы коснемся ниже. Прибавим, что трудно предполагать, чтобы только в Белоруссии существовали симбиотические отношения между представителями самопроизвольной анаэробной мочки льна.

Перейдем к возбудителям мочки. В книге, опубликованной в 1941 г., автор считал, что каждое растение имеет характерного для него возбудителя, однако Pectinobacter amylophilum оказался активным для нескольких растений. В рецензируемой книге, согласно автору, характерным для возбудителей мочки является их специфичность в отношении того или другого растения, которое данный вид микроба вымачивает эффективнее, чем другие микробы. Такая вероятность, конечно, не исключена, но экспериментально ее пока нельзя считать доказанной. Так, одним из важных аргументов автора было то, что наиболее подходящим для кенафа является Bac. cannabinus. Произведенные же в последнее время во Всесоюзном институте сельскохозяйственной микробиологии исследования показали, что возбудителями мочки этого растения являются Bac. felsineus и Granulobacter pectinovorum, а также еще один, впервые выделенный микроб, который был обнаружен в преобладающих количествах при мочке этого растения. Что касается мочки льна, то следует указать, что автором недостаточно учтены результаты работ, произведенных в СССР (Всесоюзный институт сельскохозяйственной микробиологии и Институт микробиологии Академии Наук СССР) относительно широкого распространения Bac. felsineus и роли этого микроба в самопроизвольной мочке льна.

Непонятно, почему Bac. felsineus автором считается малоактивным (стр. 75). Впрочем, на стр. 114 в одном месте этот микроб включен в число активных, а в другом месте — в числе малоактивных. Таких противоречий в книге, к сожалению, немало.

Вызывает недоумение и то, что на стр. 16 и 92 Bac. cannabinus считается наиболее подходящим для кенафа, а на стр. 90 — специфическим возбудителем для мочки льна в естественных условиях.

Следует указать, что автором придается слишком большое значение мочильной жидкости как питательной среде для специфических агентов мочки (стр. 90) и не учитывается, что размножение этих микроорганизмов происходит в значительной степени в тканях стебля.

В связи с тем, что автор не принимает во внимание того, что микробы мочки, размножаясь в тканях стебля, могут использовать и соли, не переходящие в мочильную жидкость, находится и то обстоятельство, что он в различных местах книги слишком настаивает на солевом голодании микробов мочки. Не отрицая того, что в ряде случаев прибавление тех или других солей может быть полезно, мы считаем, что не следует переоценивать значения солевого голодания, в особенности в отношении льна.

Настаивая в различных местах своей книги на необходимости прибавления солей при мочке и пытаясь выяснить механизм действия тех или других прибавок, автор игнорирует некоторые имеющиеся в этой области теоретические работы. Так, на стр. 123 говорится: «Также применение, например, соды или мочевины дало удовлетворительные результаты, но оно не экономично и не имело биологического обоснования». Между тем биологическое обоснование применения двууглекислой соды (и частью мочевины) имеется в работах А. Л. Бычковской.

Вторая глава посвящена методу повторных мочек. Автор описывает ряд повторных мочек при помощи культур Pectinobacter amylophilum, указывая, что ему удалось проводить до 12 повторных мочек. Отметим, что для повторных мочек следует брать стерильные стебли; это затрудняет применение данного способа. Описывая эти опыты, автор говорит об отдыхе мочильной жидкости и о том, что отдохнувшую жидкость одной мочки вводят в мочильную жидкость другой. Эти опыты представляют известный интерес, однако странно, что автор не отдает себе отчета в том, что при отдыхе мочильной жидкости происходит ее регенерация.

Не отрицая того, что один и тот же микроб в известных условиях может разрушать продукты своей жизнедеятельности и подавлять развитие других микробов, мы, однако, не уверены, что в опытах автора дело обстояло именно таким образом, особенно когда он работал с большими партиями льна. Стерилизация кипячением, в особенности пастеризация в течение 20—30 минут, недостаточны для устранения всех посторонних микроорганизмов.

В конце главы автор пишет, что метод повторных мочек может оказать большую

услугу при осуществлении «регенерации» мочильной жидкости. Между тем в главе об анаэробной мочке говорится: «Нередко регенерация осуществляется специально внесенными культурами, пока с неопределенной характеристикой и при одновременном прибавлении соответствующих соединений для нейтрализации кислот и питания микробов. Такая регенерация не имеет строго научного соответствующего метода и микрофлоры,— этим требованиям мог бы удовлетворять «метод повторных мочек», осуществляемый также в мочильных бассейнах, но глубоко отличный по своему биохимизму от анаэробной мочки и превосходящий ее по эффективности» (стр. 18).

Здесь непонятно противопоставление «метода повторных мочек» анаэробной мочке. Разве повторные мочки ведутся в аэробных условиях? Также непонятно, почему так безнадежно обстоит дело с изучением регенерации мочильной жидкости. По этому вопросу имеются определенные данные в литературе, о них сообщалось на конференциях; более подробные сведения печатаются в настоящее время.

Автор слишком категоричен, когда считает (стр. 122), что «из описания работ по регенерации видно, что в приемах ее проведения нет определенного плана и ясно поставленной цели».

Вообще следует подчеркнуть, что в книге дается неправильное изложение и трактовка работ по регенерации, что приводит к неправильным выводам. Ведь с помощью регенерации стремятся получить и получают ряд повторных мочек.

Работы по регенерации могут быть использованы для понимания как повторных мочек, так и аэробного способа, предложенного автором.

Относясь критически к некоторым способам мочки, в которых аэробные условия чередуются с анаэробными, сам автор в книге, опубликованной в 1941 г., говорит, что он для аэробной мочки кенафа воспользовался закваской из чистой культуры анаэробного Вас. cannabinus и что в резко выраженных аэробных условиях оказалось возможным «проявление полной жизнедеятельности анаэробного возбудителя с наилучшими результатами процесса» (И. А. Макринов, Биологическая мацерация растительных тканей, 1941, стр. 69). Это показывает, что комбинирование аэробной мочки с анаэробной не такое уже безнадежное дело.

Глава четвертая посвящена аэробной мочке, составляющей в сущности основу всей книги.

В этой главе автор описывает мочку с орошением; сущность этого способа мочки состоит в том, что снопы волокнистых растений, находящиеся в воздухе, периодически орошаются с помощью оросительного аппарата мочильной жидкостью, стекающей в бассейн, из которого она перекачивается в оросительный аппарат. Преимуществом этого способа мочки следует считать то, что он идет без накопления свободных кислот при определенно выраженной нейтральной реакции мочильной жидкости. Однако вопрос о том, какое значение pH является оптимальным для данного способа, остается открытым, так как, согласно Э. Э. Друблянец, нейтральная реакция среды способствует обильному образованию слизи, представляющей отрицательную сторону этого способа мочки.

Прежде чем перейти к дальнейшим характерным особенностям аэробной мочки, остановимся на понятии, которое, согласно автору, лежит в основе этого способа; мы имеем в виду представление о «нормальном» бактериальном «совершенном по своему биохимизму» процессе, осуществляемом при аэробном способе брожения. Последний автор противопоставляет анаэробному способу, «дефективному по самой природе».

Прежде всего следует сказать, что нельзя злоупотреблять общепринятыми терминами, придавая им какой-то особый смысл. Это может внести только путаницу. Создание нормальных условий для жизнедеятельности бактерий не является самоцелью. Поэтому нельзя считать только аэробные процессы нормальными, а анаэробные дефективными. Имеется ряд более или менее «совершенных по биохимизму» анаэробных процессов, дающих в больших количествах нужные нам продукты. Вспомним о продуктах спиртового, молочнокислого, маслянокислого и ацетоно-бутилового брожений.

Что касается улучшений, которые желательно или необходимо ввести в тот или другой процесс, то это решается в каждом случае сообразно с конкретными условиями. Этот вопрос не должен ставиться и решаться так в общей форме, как это предлагается автором книги.

Если речь идет о том, чтобы создать благоприятные условия для жизнедеятельности нужных нам микроорганизмов и устранить все то, что ей препятствует, то это представляет одну из основных задач всех областей прикладной микробиологии. Эту задачу микробиология ставит себе независимо от того, использует ли она жизнедеятельность аэробных или анаэробных микроорганизмов. Для ее решения микробиология прибегает к различного рода воздействиям, используя при этом физические, химические и биологические факторы среды.

Преимуществом аэробной мочки автор считает то, что ферменты адсорбируются вымачиваемыми растениями и что мочильная жидкость к концу мочки энзиматически мертва; в анаэробной же мочильной жидкости количество ферментов нарастает до конца мочки. Мы не будем здесь останавливаться на возможной роли в мочке волокнистых растений ферментов — катализы, пероксидазы, инвертазы, амилазы и на вопросе о том, как они действуют, находясь в адсорбированном состоянии на стебле. Укажем только, что ферменты, разлагающие пектин, не были подвергнуты исследованию в работе Троицкого, цитированной Макриновым. Но как раз эти гидролитические фер-

менты, играющие наиболее существенную роль в выделении волокна, могут, находясь в адсорбированном состоянии, инактивироваться или приобрести способность к синтезирующему действию (см. работы А. И. Опарина и А. Л. Курсанова).

Как на одну из удивительных сторон аэробной мочки автор указывает на избирательную способность вымачиваемых растений по отношению к различным полезным для мочки веществам. Согласно автору, необходимые для процесса азотистые и фосфорнокалийные соединения энергично поглощаются, а ненужное вещество ($CaCO_3$) остается в мочильной жидкости в неизменном количестве до конца мочки; выбрасываются также ненужные или вредные вещества стебля. Далее автор говорит: «Избирательная по отношению к нужным для процесса веществам способность вымачиваемой массы растений, надо думать, аналогична избирательной способности, например, корня, воспринимающего в силу осмоса и ассимиляции нужные вещества и отбрасывающие ненужные, не употребляемые» (стр. 39). Из приведенного экспериментального материала, однако, следует только то, что аммиак исчезает из жидкости. Можно предполагать, что он частично адсорбируется стеблями. Так оно и происходит в действительности; в работе, производившейся в Институте сельскохозяйственной микробиологии Э. Э. Друблянец, при прибавлении $(NH_4)_2SO_4$ при аэробной мочке льна аммиак в заметных количествах обнаруживался на стеблях. Что происходит с фосфором и с калием, по данным автора, остается невыясненным. В том, что мел остается в неизменном количестве, ничего удивительного нет; автор ведь указывает, что аэробная мочка происходит при нейтральной реакции; мел при этом не растворяется, и поэтому он (или точнее кальций) не мог быть адсорбирован стеблями. То, что часть веществ (красящих, дубильных и др.) вымывается, а другая часть остается в стебле, также не имеет никакого отношения к избирательной способности вымачиваемых растений.

Говорить об избирательной способности вымачиваемых стеблей и сравнивать поведение вымачиваемой массы растений в этом отношении с живым корнем более чем странно. Трудно предположить, чтобы стебли, находящиеся в состоянии разложения, обладали способностью, которая навряд ли имеется в такой выраженной форме даже у живых стеблей. Это противоречит нашим физиологическим представлениям.

Не оспаривая того, что способ аэробной мочки, предложенный И. А. Макриновым, представляет и теоретический и практический интерес, теорию процесса в том виде, как он дается автором, следует, однако, признать неправильной. Кроме приведенных выше, в книге имеются и другие противоречия, но из-за недостатка места мы на них не можем останавливаться.

В главах, посвященных конопле, кенафу и другим волокнистым растениям, микробиологического материала мало или он почти отсутствует.

Оценивая микробиологическую часть книги в целом, мы должны сказать, что, к сожалению, не находим в ней того научно-теоретического обоснования процесса мочки, которое автор во введении обещает дать.

Заканчивая рецензию, укажем, что мы не касаемся технологической и ботанической частей книги, надеясь, что книга подвергнется критическому разбору со стороны соответствующих специалистов.

На основании вышесказанного мы не находим возможным рекомендовать книгу в качестве пособия для практических работников и студентов. Она не может восполнить отсутствие руководства по микробиологии и биохимии мочки волокнистых растений. Пользование книгой требует критического отношения к приводимым в ней материалам.

Г. Л. Селибер

БИБЛИОГРАФИЯ

Общая микробиология

Бошьян Г. М. О природе вирусов и микробов. 2-е (исправл.) издание. М. Медгиз. 1950. 148 стр. с илл. Тираж 100 000 экз. Цена с перепл. 7 р. 30 к.

Бошьян Г. М. Новое о природе вирусов и микробов.— Советская зоотехния, 1950, № 7, стр. 3—9.

Бошьян Г. М. О природе вирусов и микробов.— Ветеринария, 1950, № 7, стр. 6—13.

Голощапов Ю. Выдающееся открытие советского ученого. (По поводу книги Г. М. Бошьяна «О природе вирусов и микробов»).— Ветеринария, 1950, № 6, стр. 6—7.

Голышева М. Г. Морфология развития грибка Eremothecium ashbyii.— Доклады Академии Наук СССР, Новая серия, т. LXXIII, 1950, № 3, стр. 585—587.

Горленко М. В. и Воронкевич И. В. Фитопатогенные бактерии и насекомые-переносчики. (Сообщение 2).— Успехи совр. биологии, т. XXIX, 1950, вып. 3, стр. 458—463.

Ивановский Д. И.— создатель науки о вирусах. Библиографическая памятка. Ростов на Дону. Изд. Обл. библиотеки. 1950. 14 стр. Тираж 2 000 экз. Цена не указ.

Коропов В. М. Новое о природе вирусов и микробов. (По поводу работы Г. М. Бошьяна).— Ветеринария, 1950, № 8, стр. 7—9.

Кравченко А. Т. Природа вирусов.— Военно-медицинский журнал, 1950, № 7, стр. 40—49.

Мейсель М. Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов. М.— Л. Изд. Академии Наук СССР. 1950. 368 стр. с илл. и 5 л. илл. Тираж 3000 экз. Цена 21 р. (Институт микробиологии АН СССР).

Миндлина Д. С. и Латышева М. С. Оценка бактериологических питательных сред, приготовленных разными методами, и влияние исходного сырья на их качество.— Труды Всесоюзного научн.-иссл. ин-та мясной промышленности, 1950, вып. 3, стр. 148—162.

Мишустин Е. Н. Среда и изменчивость микроорганизмов.— Гигиена и санитария, 1950, № 5, стр. 5—12.

Мишустин Е. Н. Термофильные микроорганизмы в природе и практике. М.— Л. Изд. Академии Наук СССР. 1950. 392 стр. с илл. и 11 л. илл. Тираж 5000 экз. Цена 21 р. 50 к.

Муромцев С. Н. Проблема современной микробиологии в свете мичуринского учения. Стенограмма публичной лекции, прочитанной в Центральном лектории об-ва в Москве. М. Изд-во «Правда». 1950. 32 стр. Тираж 65 000 экз. Цена 60 к. (Всесоюзн. об-во по распространению политич. и научных знаний).

Программа по микробиологии (для географических факультетов гос. университетов). Специальность «климатология». Утвержд. Главн. управл. университетов. М. Изд. МГУ 1950. 2 стр. Тираж 2000 экз. Составил Б. Алисов.

Разумовская З. Г. и Васильева О. А. Влияние глюкозы на процесс окисления сорбита Acetobacter melanogenum.— Труды Ленинградского об-ва естествоиспытателей, т. LXX, 1950, вып. 3, стр. 124—133.

Самарина О. П., Крицман М. Г., Якобсон Л. М. и др. Аминокислотный состав бактерий.— Биохимия, 1950, вып. 3, стр. 287—290.

Соколов М. И. и Яковлев А. И. Современные достижения отечественной вирусологии.— Бюлл. эксп. биологии и медицины, 1950, № 3, стр. 161—170.

Хейфец М. А. Камера для пестрого ряда (Определение свойств микробов).— Военно-медицинский журнал, 1950, № 5, стр. 43—45.

Чесноков В. А. О переработке органических кислот грибком Aspergillus niger. Труды Ленинградского об-ва естествоиспытателей, т. LXX, 1950, вып. 3, стр. 91—108.

Шамис Д. Л. Микробы в нашей обыденной жизни. Алма-Ата. Из-во АН Каз.ССР. 1950. 26 стр. с илл. Тираж 5000 экз. Цена 1 р.

Сельскохозяйственная микробиология

Агарков В. А. Бактериоз эндосперма ячменя.— Селекция и семеноводство, 1950, № 6, стр. 48—50.

Антипова Л. К. Устойчивость картофеля эпиляжне.— Сад и огород, 1950, № 8, стр. 34—36.

Арсеньева М. В. Фомоз корнеплодов и капусты.— Сад и огород, 1950, № 8, стр. 24—25.

Безденко Т. Т. Вредители и болезни кок-сагыза и меры борьбы с ним. Минск. гос. изд-во БССР. 1950. 79 стр. с илл. Тираж 5000 экз. на белорус. яз. Цена 1 р.

Бельтюкова К. И. О результатах изучения штаммов Bact. vesicatorium, выделенных в Украинской ССР.— Микробиологич. журнал (Киев), т. XII, 1950, вып. 1, стр. 11—16 (на украинск. яз.)

Брежнев И. Е. Микофлора почвы заповедника «Лес на Ворксле».— Учен. записки Ленингр. гос. универс. Серия биологич. наук, 1950, вып. 25, стр. 130—150.

Брежнев И. Е. Обзор микофлоры заповедника «Лес на Ворксле» (Борисовский район Курской области).— Труды Ленингр. об-ва естествоиспытателей, т. LXX, 1950, вып. 3, стр. 263—287.

Вердеревский Д. Д. Болезни винограда и борьба с ними.— Доклады 1-й научной сессии Молдавской научно-иссл. базы Академии Наук СССР. Кишинев. 1950, стр. 123—127.

Вредители и болезни овощных культур и меры борьбы с ними. Симферополь, Крымиздат. 1950. 96 стр. с илл. Тираж 3000 экз. Цена 3 р.

Гандельман С. С. Значение летних посадок картофеля в борьбе с картофельным раком.— Сад и огород, 1950, № 6, стр. 61—64,

Глазовская М. А. Влияние микроорганизмов на процессы выветривания первичных минералов.— Изв. Академии Наук КазахССР, серия почвовед.; 1950, вып. 6, стр. 79—100.

Гречушников А. И. и Яковлева Н. Н. Изменение активности пероксидазы у ракоустойчивых и восприимчивых к раку сортов картофеля в процессе их заражения Synchytrium endobioticum Schilb. (Perc.).— Доклады Академии Наук СССР, Новая серия, т. LXXIII, 1950, № 1, стр. 207—208.

Гринфельд Е. К. Фауна древесины и коры дуба.— Ученые записки Ленингр. гос. университета, серия биологич. наук, 1950, вып. 25, стр. 228—238.

Давыдов П. Н. Иноземные гости (Сорняки и вирусные болезни с/х растений, занесенные в СССР во время Второй мировой войны).— Природа, 1950, № 6, стр. 75—76.

Дитковский В. Я. О микрофауне неогеновых отложений некоторых районов Молдавской ССР.— Доклады Академии Наук УкрССР, 1950, № 2, стр. 113—118 (на украинск. яз.).

Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения Ереван. Армянгиз. 1950. 48 стр. с илл. Тираж 3000 экз. (на арм. яз.), цена 75 к.

Запрометов Н. Г. Бактериоз дыни и борьба с ним.— Сад и огород, 1950, № 5, стр. 42.

Заремба В. П. и Синявская Л. А. О повышении эффективности действия нитрагина.— Микробиологич. журн. Киев, т. XII, 1950, вып. 1, стр. 17—24 (на украин. яз.).

Ибрагимов Г. Р. Новая болезнь стручкового перца и меры борьбы с ним.— Сад и огород, 1950, № 8, стр. 28.

Инструктивные указания по обследованию посевов и проведению мероприятий по борьбе с бактериальным раком томатов. Вильнюс. Изд гос. инспекции по карантину с/х растений. 1950. 13 стр. Тираж 500 экз. Цена не указ.

Канивец И. И. Роль микрофлоры и культурной растительности в повышении доступности элементов питания в почве.— Доклады Всесоюзной академии с/х наук им. Ленина, 1950, вып. 7, стр. 20—25.

Киракосян А. В. и Хачатрян Г. А. Вирусные болезни картофеля, выявленные в Армении.— Изв. Академии Наук Армян. ССР, Биологич. и с/х науки, 1950, № 4, стр. 333—345.

Костюк П. Н. Как сохранить виноградник от мильдью. Одесса. Изд. Укр. научно-иссл. ин-та виноград. и виноделия им. В. Е. Танрова. 1950. 12 стр. с илл. Тираж 2000 экз. Цена не указ.

Кублицкая М. А. Фузариоз виноградной лозы в Узбекистане.— Виноделие и виноградарство СССР, 1950, № 6, стр. 37.

Наумов Н. А. Перспективы изучения болезней древесных пород в условиях степного лесоразведения.— Ученые записки Ленингр. госуниверситета, серия биологич. наук, 1950, вып. 25, стр. 42—51.

Новогрудский Д. М. Внутривидовые и межвидовые взаимоотношения почвенных микроорганизмов и некоторые вопросы применения бактериальных удобрений.— Изв. Академии Наук Каз. ССР, Серия почвовед., 1950, вып. 6, стр. 109—120.

Орлова А. А. и Гурова И. К. Болезни желудей дуба.— Лесное хозяйство, 1950, № 6, стр. 57—59.

Панфилова Т. С. Борьба с пятнистым антракнозом винограда в Средней Азии.— Виноделие и виноградарство СССР, 1950, № 7, стр. 27—28.

Парамонов А. А. К методике стерилизации почвы паром при галловом гетеродерозе тепличных культур.— Труды Всес. ин-та гельминтологии им. Скрябина, т. IV, 1950, стр. 156—170.

Перцева А. Н. Микробиологические процессы при компостировании низинного торфа. Доклады Всес. Академии с/х наук им. Ленина, 1950, вып. 6, стр. 19—25.

Петрушова Н. И. Меры борьбы с фузариозом саженцев в питомнике.— Сад и огород. 1950, № 8, стр. 76—77.

Пивкина А. Ф. Как бороться с болезнями овощных культур. Хабаровск. Дальневосточное краевое гос. из-во. 1950. 56 стр. с илл. Тираж 2000 экз., Цена 80 к.

Программа по почвенной микробиологии (для почвенных отделений биолого-почвенных факультетов госуниверситетов). Состав. Н. Сушкина (утвержд. Главн. управл. университетов). М. Изд. Моск. университета. 1950. 12 стр. Тираж 3000. Цена не указ.

Проценко Е. П. и Проценко А. Е. Кольцевая мозаика сирени — инфекционное заболевание.— Бюлл. Главн. ботанич. сада, 1950, вып. 5, стр. 46—50.

Результаты изучения бактериозов, поражающих зерновые культуры на территории Украинской ССР. Сообщ. 2-е К. И. Бельтюкова и Е. А. Бакалинская. Бактериальная пятнистость сорго.— Микробиологич. журн., Киев, т. XII, 1950, вып. 1, стр. 3—10 (на украинск. яз.).

Результаты исследования действия некоторых антибиотических веществ на возбудителей бактериозов растений. Сообщ. 1-е. К. И. Бельтюкова и П. И. Кисель. Изучение действия водных дистиллятов сонтравы и протоанемонина на возбудителей бактериозов растений in vitro.— Микробиологич. журн. Киев, т. XII, 1950, вып. 1, стр. 83—91 (на украин. яз.)

Рыжков В. Л., Смирнова В. А. и Городская О. С. Влияние некоторых красок на вирусный нуклеопротеид мозаичной болезни табака.— Биохимия, 1950, вып. 3, стр. 222—229.

Савченко Е. Н. и Савинский П. И. Вредители и болезни кок-сагыза и борьба с ними. Киев — Харьков. Госиздательство с./х. литературы Укр. ССР, 1950, 92 стр. с илл. Тираж 3000 экз. (на укр. яз.). Цена 2 р. 50 к.

Тетеревникова-Бабаян Д. Н., Кечек Н. А. и Степанян Т. Г. Болезни люцерны в Армянской ССР.— Изв. Академии Наук Арм. ССР, Биологич. и с/х науки, 1950, № 3, стр. 227—241.

Федоров М. В. Влияние окислительных индикаторов на интенсивность дыхания азотобактера и фиксацию им азота атмосферы.— Доклады Академии Наук СССР, Новая серия, т. LXXII, 1950, № 6, стр. 1131—1133.

Федоров С. М. Фенологический календарь защиты плодового сада от вредителей и болезней (Сроки защитных мероприятий, техника их применения и главнейшие вредители и болезни плодового сада). Ставрополь. Крайиздат, 1950. 120 стр. с илл. Тираж 5000 экз. Цена 2 р. 50 к.

Целле М. А. Болезни шелковицы и меры борьбы с ними. Киев. Изд-во Академии Наук УкрССР, 1950. 20 стр. с илл. Тираж 5000 экз. (на украин. яз.). Цена 50 к.

Чуксанова Н. А. Различные формы мозаик у картофеля как фазы единого заболевания.— Труды Ленингр. об-ва естествоиспытателей, т. LXX, 1950, вып. 3, стр. 245—262.

Шворнева А. М. Бактериальное заболевание арбуза.— Сад и огород, 1950, № 8, стр. 77—78.

Штейнхауз Э. Микробиология насекомых. Перев. с англ. Бельговского. М.— Л. Под ред., с предисл. Н. А. Красильникова. М. Изд-во иностр. лит-ры. 1950. 768 стр. с илл. Тираж не указ. Цена 41 р. 70 к. На стр. 629—699 дана библиография.

Техническая и пищевая микробиология

Букса Л. Г. Влияние магнитного поля, электрического поля УВЧ и ультрафиолетовых лучей на размножение дрожжей.— Труды Молотовского гос. медицинского ин-та, 1950, вып. 24—25, стр. 99—103.

Квасников Е. И. и Хроликова В. Г. Дрожжи в виноделии Средней Азии.— Виноделие и виноградарство СССР, 1950, № 7, стр. 31—35.

Косиков К. В. Направленная изменчивость ферментативных свойств дрожжей под влиянием препаратов, полученных из родственных штаммов.— Доклады Академии Наук СССР, Новая серия, т. LXXIII, 1950, № 2, стр. 381—384.

Лойцянская М. С. и Гурфель Д. Б. Влияние глюкозы на накопление уксусной кислоты бактериями.— Труды Ленингр. об-ва естествоиспытателей. т. LXX, 1950, вып. 3, стр. 134—139.

Одинцова Е. Н. Современные задачи микробиологии в виноделии и виноградарстве.— Виноделие и виноградарство СССР, 1950, № 6, стр. 41—42.

Палладина О. К. и Мазюкевич В. А. Руководство для бактериологов и работников молочных цехов маргариновых заводов. Л. Из-во Ленжиркомбината, 1950. 273 стр. с черт. Тираж 300 экз. Цена не указ.

Самсонов Н. Организация контроля за качеством заквасок.— Молочная промышленность, 1950, № 5, стр. 38.

Тер-Карапетян М. А. Выращивание микроорганизмов в логарифмической фазе в инокуляторе с пропеллером.— Изв. Академии Наук АрмССР, Биологич. и с/х науки, 1950, № 5, стр. 433—444.

Цыганков М. Ф. Полупроизводственное испытание местных рас Saccharomyces ellipsoideus. (Культура дрожжей для виноделия).— Изв. Туркм. филиала Академии Наук СССР, 1949, № 4, стр. 42—49.

ХРОНИКА

ГЕОРГИЙ ДМИТРИЕВИЧ БЕЛОНОВСКИЙ

25 июля 1950 г. на 76-м году жизни скончался один из старейших и крупных ученых-микробиологов Советского Союза — член-корреспондент Академии Наук СССР, заслуженный деятель науки, заведующий кафедрой микробиологии Ленинградского государственного ордена Ленина института усовершенствования врачей имени С. М. Кирова профессор Георгий Дмитриевич Белоновский.

Г. Д. Белоновский родился 21. II. 1875 г. в Полтавской области в семье народного учителя. Среднее образование получил в гимназии г. Лубны, а высшее — в Военно-медицинской академии, которую окончил с отличием в 1899 г. В 1900 г. Георгий Дмитриевич был назначен помощником заведующего бактериологической лаборатории Кронштадтского военно-морского госпиталя, где работал под руководством известного русского бактериолога В. И. Исаева.

В 1902 г. Г. Д. Белоновский защитил диссертацию на тему: «О влиянии впрыскиваний разных доз гемолитической сыворотки на числовой состав элементов крови» на степень доктора медицины. В этой работе Георгий Дмитриевич подробно разобрал способы получения гемолитических сывороток, предложил некоторые новые методы и указал на терапевтическую сторону нарождавшегося тогда учения о цитотоксинах. После защиты докторской диссертации Г. Д. Белоновский полтора года работал на бывшем форте Александра I по изучению бактериологии и иммунитета чумы.

В конце 1905 г. Георгий Дмитриевич был командирован за границу для усовершенствования по бактериологии и подготовки к профессорскому званию. Он работал в лабораториях таких известных ученых, как Мечников, Моргенрот, Сальковский и Райт. Работа в лаборатории И. И. Мечникова была посвящена вопросу об антагонизме микробов и бактериотерапии, а отчасти учению о цитотоксинах; им была получена новая цитотоксическая сыворотка — гастротоксическая, направленная против клеток эпителия кишечника. Общение с таким ярким передовым ученым, как И. И. Мечников, оказало большое влияние на научные интересы молодого Белоновского.

По возвращении из-за границы в 1908 г. Георгий Дмитриевич получает звание приват-доцента сначала в Женском медицинском институте, а затем в Военно-медицинской академии. В 1909 г. Г. Д. Белоновский приглашается штатным ассистентом, а затем доцентом в Институт для усовершенствования врачей (бывший клинический институт) на кафедру гигиены, возглавлявшуюся проф. Г. В. Хлопиным.

В 1917 г. Г. Д. Белоновский избирается профессором и заведующим вновь учрежденной кафедры бактериологии Государственного института усовершенствования врачей, которую занимал до самых последних дней своей жизни.

Первые годы самостоятельного существования кафедры бактериологии совпали с тяжелым временем разрухи в результате первой империалистической войны. Но, несмотря на большие трудности, Георгий Дмитриевич сумел оборудовать кафедру согласно требованиям современной науки и образцово поставить в ней преподавание и научную работу.

Г. Д. Белоновский был одним из первых русских ученых, безоговорочно вставших на сторону молодой советской власти и принявших активное участие в проведении важнейших мероприятий по здравоохранению. Георгий Дмитриевич всегда связывал свою научную деятельность с интересами социалистического здравоохранения и, как истинный патриот своей Родины, интересы народа ставил превыше всего.

Г. Д. Белоновский является автором свыше ста научных работ по разнообразным вопросам микробиологии, иммунологии, эпидемиологии. Но основная его научная деятельность была сосредоточена на изучении сущности иммунитета, на проблеме активной борьбы с инфекционными заболеваниями. В 1918 г., во время эпидемии испанского гриппа, им, совместно с проф. Таранухиным, делается сообщение о том, что возбудителем этой инфекции является не банальная палочка Пфейфера, а невидимый фильтрующийся вирус. Это исследование является первым в русской и одним из первых в европейской литературе по вопросу о возбудителе гриппа. С 1921 г. Георгий Дмитриевич вместе со своими учениками проводит большие исследования по вопросам сущности и динамики иммунитета в целях использования его для борьбы с инфекционными заболеваниями. В результате этих работ им созданы новые направления в иммунологии («опсонизация лекарств», «химиовакцинотерапия», «органотоксис» и т. д.). Г. Д. Белоновский один из первых в СССР использовал метод тканевых культур с целью изучения ряда вопросов иммунитета и инфекции (иммунизации против туберкулеза при помощи Кальметтовской вакцины, иммунитета при дифтерии, выяснения сущности скарлатины, изменчивости микробов и т. д.). Георгий Дмитриевич предложил свой способ иммунизации против скарлатины, который в настоящее время как метод представляет интерес для борьбы и с другими инфекциями. Г. Д. Белоновский является одним из пионеров специфической профилактики туберкулеза в СССР, а также использования молочнокислых микробов в целях бактериотерапии в нашей стране.

За последние годы Георгий Дмитриевич уделял много внимания изучению десенсибилизирующего действия различных физиотерапевтических процедур, что представляет и большой практический интерес при лечении заболеваний с аллергическими наслоениями. В 1929 г. Георгий Дмитриевич был избран членом-корреспондентом Академии Наук СССР. В 1934 г. Академия Наук СССР за совокупность работ по иммунитету присудила ему степень доктора биологических наук.

Ученик выдающихся русских ученых И. И. Мечникова и В. И. Исаева, Г. Д. Белоновский был основателем кафедры микробиологии при Государственном университете усовершенствования врачей и на протяжении всей своей жизни вел большую педагогическую деятельность. Георгий Дмитриевич подготовил многочисленные кадры специалистов врачей — микробиологов и эпидемиологов, работающих в разных местах нашей Родины. Из них некоторые занимают кафедры в медицинских институтах.

Его смелые суждения, соединенные с богатой, здоровой научной фантазией, всегда вызывали живой интерес, возбуждая мысль и раскрывая перед слушателями широкие горизонты.

Весьма многообразной была общественная деятельность Г. Д. Белоновского. В течение ряда лет он состоял членом Всесоюзной комиссии БЦЖ НКЗ Союза ССР, членом Ученого медицинского совета Ленгорздравотдела, председателем противогриппозного комитета Ленгорздравотдела и других организаций. Жизнь Георгия Дмитриевича — это образец упорного труда, верного и честного служения науке и общественности.

Правительство высоко оценило заслуги Г. Д. Белоновского, присвоив ему звание заслуженного деятеля науки и наградив его орденами «Трудового Красного Знамени», «Знаком почета» и медалями.

Память о Г. Д. Белоновском надолго сохранится в сердцах его многочисленных учеников и всех знавших его.

Группа учеников

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ РАБОТЫ В АКАДЕМИИ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР

I

З. Ф. Теплякова (Институт почвоведения Академии Наук Казахской ССР) закончила диссертационную работу на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы почв Казахстана». Объектами исследования были почвы степной и пустынной зоны (черноземы среднегумусные и малогумусные, темнокаштановые, светлокаштановые, бурые), солонцы и солончаки, почвы предгорий и подгорных равнин (черноземные, светлокаштановые, серозем), малоразвитые почвы и продукты выветривания коренных горных пород. Целлюлозоразрушающие бактерии представлены в почвах Казахстана видами Cytophaga и Cellvibrio. Из солонцов и солончаков изолированы и описаны два галофильных целлюлозоразрушающих вибриона, один облигатно галофильный (названный Cellvibrio Winogradskii), для которого оптимальное содержание NaCl в питательной среде равно 2,5%, другой (Cellvibrio halophilus) факультативно галофильный. Целлюлозоразрушающие грибы представлены в почвах Казахстана главным образом Rhizophlyctis rozea, различными видами Chaetomium Gliobohys и Monotospora. Виды Trichoderma, Fusarium, Penicillium, указываемые для почв других областей как энергичные целлюлозоразрушители, в почвах Казахской ССР мало распространены. Целлюлозоразрушающие актиномицеты

в почвах Казахстана встречаются редко. Из них некоторое значение имеют Actinomyces globisporus и Micromonospora vulgaris. В географическом распространении целлюлозоразрушающих грибов и бактерий наблюдаются закономерные отношения. По мере продвижения с севера на юг роль бактерий в процессах разрушения клетчатки уменьшается, а роль грибов возрастает. Так, в целинных среднегумусных и малогумусных черноземах относительная активность целлюлозоразрушающих бактерий во много раз больше, чем грибов. В карбонатных малогумусных черноземах, в темно- и светлокаштановых и в бурых почвах отношения обратные; в них относительная активность целлюлозоразрушающих бактерий меньше, чем грибов.

II

Институт почвоведения АН Казахской ССР и Институт земледелия Казахского филиала Академии сельскохозяйственных наук имени В. И. Ленина проводят с 1949 г. на Шортандинской с.-х. опытной станции (Акмолинская область) комплексное изучение динамики плодородия в полях травопольного зернового севооборота. Почвенные исследования проводятся под руководством С. П. Матусевича; микробиологическими исследованиями руководит Д. М. Новогрудский, агротехническими — Д. С. Певнев. В 1950 г. проводится изучение новых методов применения бактериальных удобрений, динамики микрофлоры в полях травопольного севооборота и процессов структурообразования.

III

М. А. Глазовской (Институт почвоведения АН Казахской ССР) проведены экспериментальные исследования в целях выяснения роли населяющих скалы микроорганизмов в процессах разрушения первичных минералов. Для исследования были взяты ортоклаз, мусковит, биотит, серпентин, апатит и пирит — минералы, содержащие те или иные необходимые микроорганизмам элементы.

Материалом для заражения служили выветренные корки гранита, собранные на абс. в. 4250 м в хребте Терской Ала-Тау.

Анализы состава развившейся на минералах микрофлоры в сочетании с минералогическими и химическими анализами установили следующее:

1. Микроорганизмы, обитающие на поверхности скал, могут использовать в качестве источников жизненно необходимых элементов различные первичные минералы.

2. Рост микроорганизмов сопровождается разрушением минералов и синтезом новых минеральных и органо-минеральных образований. В этом процессе принимают участие различные группы микроорганизмов.

3. В условиях недостатка или полного отсутствия органических веществ развиваются прототрофные и олигонитрофильные микроорганизмы, диатомовые водоросли, зеленые и сине-зеленые водоросли и сопутствующие им кокковидные бактерии. Комплекс этих микроорганизмов заметно разрушает минералы.

4. В условиях достаточного количества органических углерода и азота, наряду с указанными микроорганизмами, происходит бурный рост грибов из рода Penicillium, очень интенсивно разрушающих минералы.

5. Разрушающее действие грибной микрофлоры на минералы связано с выделением ими окрашенных органических кислот, сходных в некоторых своих свойствах с фракциями гуминовой и фульвокислой почвенного гумуса.

6. Минералы обладают различной устойчивостью по отношению к действию микроорганизмов. Наиболее интенсивно разрушается мусковит. Наиболее стойким минералом является ортоклаз.

7. Наряду с разрушением минералов происходит синтез вторичных глинных минералов и вторичного кальцита. В образовании кальцита принимают участие зеленые и сине-зеленые водоросли и, возможно, сопутствующие им кокковидные бактерии.

8. Накопление в продуктах выветривания гидратов окислов железа также связано с деятельностью зеленых водорослей из рода Chlorococcum, способных накапливать в своих телах до 1,0% Fe_2O_3, в условиях, где железо присутствует лишь в форме первичных минералов.

IV

Лабораторией брожений сектора микробиологии Академии Наук Казахской ССР проводятся подготовительные работы по внедрению в 1950 г. в производство плодоягодных вин способа спиртования сусла до брожения с применением для целей сбраживания такого сусла дрожжей, подвергшихся направленному испытанию.

Опыты по увеличению бродильной силы винокуренных дрожжей путем направленного их воспитания будут проведены в текущем году на одном из винокуренных заводов республики.

Д. Л. Шамис

Санитарная микробиология

За последние годы в нашей стране значительно развилась и оформилась в качестве самостоятельной научной дисциплины санитарная бактериология. Неразрывно связанная с гигиеной, с ее теоретическими проблемами и практическими мероприятиями, санитарная бактериология призвана изучать микроорганизмы и вызываемые ими процессы во внешней среде с точки зрения их общесанитарного значения.

Новое понимание внешней среды как биосферы, где тесно переплетены между собой физико-химические и биологические процессы, выдвинуло перед санитарной бактериологией новые большие задачи. К ним прежде всего относятся: изучение микрофлоры внешней среды и условий жизнедеятельности микробов как санитарного фактора, а также изучение процессов, где микрофлора играет ведущую роль как в естественном самоочищении внешней среды (водоемы, почвенный покров, атмосферный воздух), так и в искусственно создаваемой внешней среде (жилые и общественные здания, населенные места, промышленные предприятия); исследование антагонизма микробов, его значения в самоочищении внешней среды от загрязнений; установление так называемых санитарных показателей (бактериологических) загрязнения отдельных элементов внешней среды (воздуха, воды и водоемов, почвы населенных мест); разработка санитарно-бактериологических приемов воздействия на внешнюю среду в целях ее оздоровления и др.

Учитывая огромное значение изучения проблем санитарной бактериологии как для научного понимания происходящих во внешней среде процессов, так и использования последних в целях санитарной охраны и оздоровления внешней среды, Институт общей и коммунальной гигиены Академии медицинских наук СССР (руководитель — действительный член АМН проф. А. А. Сысин) создал отдел санитарной микробиологии, который в соответствии с названными выше задачами в этой области развертывает научно-исследовательскую работу. В 1949 г. отдел санитарной микробиологии комплексно совместно с другими отделами института проводил ряд исследований в различных областях и, в частности, в области выяснения роли отдельных микробиологических процессов при загрязнении и самоочищении воды, почвы и воздуха.

Так, например, завершена работа (исполнитель — кандидат медицинских наук М. Г. Киченко) по изучению бактериального состояния Волги у ряда городов. В связи с этим летом 1949 г. была проведена специальная экспедиция отдела санитарной микробиологии института. На основании результатов ее работы установлено, что, благодаря значительному и быстрому самоочищению, в Волге происходит довольно быстрое отмирание бактерий по всему ее течению, за исключением района Ярославля. В районе Куйбышева и Саратова наблюдалось значительное загрязнение Волги нефтяными остатками.

Работа, посвященная санитарным показателям загрязнения и самоочищения почвы (исполнители — проф. Е. Н. Мишустин и кандидат биологических наук М. И. Перцовская), преследовала цель определить показательные свойства отдельных микробов при загрязнении и самоочищении почвы. Полученные результаты позволили сделать следующие выводы в работе.

1. Наблюдавшееся преобладание в почвах цитратположительных форм кишечной палочки было вызвано неравномерным развитием отдельных видов группы колиаэрогенес. Типичная кишечная палочка в условиях почвы отмирает скорее, чем цитратположительные виды.

2. На модельных опытах было проиллюстрировано, что при наличии определенных форм органического вещества (гороховой муки) в почве происходит отбор цитратположительных форм группы коли-аэрогенес. Отсюда можно заключить, что почвенная среда с определенным режимом содействует более длительному сохранению в ней лишь определенных видов микробов, попавших в нее с фекальными загрязнениями.

3. В фекалиях человека и животных доминирует типичная кишечная палочка; преимущественное нахождение в почве бактерий аэрогенес объясняется, по мнению авторов, отбором, а не характером первичного загрязнения.

4. Как бактерии коли, так и бактерии аэрогенес в условиях почвенной среды являются обычными формами. Относительное обогащение почвы одной из отмеченных форм отражает лишь определенный момент в процессе самоочищения почвы.

5. На основании сказанного выше можно подтвердить положение, что доминирование бактерий аэрогенес в почве говорит о старом ее загрязнении.

6. В свежезагрязненных почвах между количеством спороносных и неспоронос-ных бактерий наблюдается значительное соотношение, которое сближается в процессе их самоочищения.

7. Массовое появление в почве Bac. mycoides было связано с наличием в ней значительных количеств азотсодержащих органических веществ.

Следующая работа (исполнитель — кандидат медицинских наук М. Г. Киченко) — о распространении бактерий в воздухе закрытых помещений на разных уровнях. На основании специальных исследований и наблюдений было установлено, что воздух наиболее загрязнен на уровне человеческого роста. При этом загрязнения зависят от числа людей, находившихся в помещении, и санитарного состояния самих помещений.

Далее, исследование по выяснению санитарно-бактериологических показателей загрязнения воды (исполнители — проф. А. С. Разумов и научный сотрудник

Л. Е. Корш). Работа велась на небольшом заливе одного из водохранилищ канала им. Москвы, где была стоянка пловучего дома отдыха и где неподалеку от него находился пляж. Пробы воды здесь отбирались одновременно как на одном, так и на противоположном берегах, а также на середине залива. При изучении этих проб воды учитывалось общее число бактерий на МПА счетом колоний через 48 часов выращивания при 20°.

На основании анализа полученных материалов по работе сделаны следующие выводы: пловучий дом отдыха, так же как и пляж, расположенный около него, вносили заметное бактериальное загрязнение. Значительное загрязнение получал и противоположный берег водоема, в летнее время посещаемый эксурсиями из Москвы, в особенности в праздничные дни. Эти загрязнения в процессе работ имели лишь местный характер и не распространялись сколько-нибудь далеко от места их поступления; количественно эти загрязнения не велики и потому не сказывались на процессах, определяющих количество бактерий в незагрязненных участках водохранилища. Вместе с тем в результате наблюдений впервые было выявлено весьма интересное положение о роли зоофитопланктона в отношении действия его на процесс отмирания бактерий, а именно: проф. А. С. Разумов выделил из зоофитопланктона вещества типа антибиотиков.

В текущем году отдел санитарной микробиологии продолжает исследования в тех же областях.

Д. Розенберг

СОДЕРЖАНИЕ

А. А. Имшенецкий и Л. А. Кузюрина. О бактериотрофных микроорганизмах (к эволюции хищничества и паразитизма) 3
Я. П. Худяков и Ю. М. Возняковская. Чистые культуры микоризных грибов 13
Г. Л. Селибер и Н. А. Головкина. Образование растворимых органических кислот при разложении жира Aspergillus niger 20
А. К. Родопуло. О метаболизме Bacillus botulinus 26
А. П. Клыков. Семядольный бактериоз сои и борьба с ним 33
Ю. И. Шнейдер. Результаты изучения бактериального некроза цитрусовых 41
К. М. Степанов. Может ли короед Hypothenemus lezhavai Piatn. распространять инфекционное усыхание лимонов («мальсекко»)? 52
А. С. Коникова и М. Г. Крицман. Применение метода меченых атомов в микробиологии (Обзор) 58
Рефераты 72
Критика и библиография 77
Хроника 84

Т-00113 Подписано к печати 20/I 1951 г. Печ. л. 7,53+1 вклейка
Уч.-изд. л. 8,6. Форм. бум. 70×108 1/16. Бум. л. 2 3/4. Тираж 5000 экз. Заказ 787

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

Статьи, представляемые в редакцию, должны быть тщательно отредактированы в рукописи. Сообщаемые в статье результаты экспериментальных исследований должны быть изложены кратко и ясно, а в конце статьи должны быть выводы. Никакие исправления в корректуре против рукописи не допускаются.

Рукопись, в том числе и литература, должна быть четко переписана на машинке на одной стороне листа писчей бумаги с двумя интервалами. Объем представляемых работ, включая таблицы и литературу, не должен превышать 14—15 страниц, перепечатанных на машинке. С левой стороны листа должны быть оставлены чистые поля (3—4 см). В редакцию посылается первый, перепечатанный на машинке, экземпляр. Страницы рукописи должны быть перенумерованы единой нумерацией, включая основной текст, таблицы, литературу и т. д. Обозначение за одним номером нескольких страниц (например 21а, 21б) не допускается. В конце рукописи обязательно должны быть собственноручная подпись автора, название учреждения, где выполнена работа, и точный его адрес.

Таблицы должны находиться в соответствующих местах рукописи и в тексте на них должны быть ссылки. Подзаголовки таблиц должны быть краткими, но их необходимо писать полностью, без сокращений.

Количество иллюстраций должно быть минимальным, они должны быть совершенно отчетливыми и выполнены тушью на белой бумаге или на кальке. На полях рукописи указывается место рисунка, а в тексте на него дается ссылка. Фотографии печатаются только при абсолютной их необходимости, причем они должны быть контрастными и в черных тонах. На микрофотографиях должно быть указано увеличение, при котором произведен снимок.

На обороте каждого рисунка должны быть написаны простым карандашом: фамилия автора, заглавие статьи, номер рисунка и страница рукописи, к которой он относится. Подписи к иллюстрациям даются на особом листе с указанием номеров рисунков.

Статья должна содержать результаты собственных исследований автора и поэтому в ней разрешается приводить только очень краткие ссылки на литературу.

Приводить названия цитируемых работ в тексте статьи или в сносках нельзя. Вся литература должна быть сведена в особый список, помещаемый в конце статьи. Перечень литературы приводится в алфавитном порядке авторов и нумеруется; для русских и иностранных работ составляются самостоятельные алфавитные списки. Ссылаться на неопубликованные в печати работы и устные сообщения не разрешается.

Отдельные работы одного и того же автора располагаются в хронологической последовательности; в случае наличия у автора нескольких работ, изданных в одном году, они нумеруются строчными буквами алфавита (напр. 1927a; 1927b, 1927c).

В списках литературы должны даваться следующие данные: а) фамилия, б) инициалы, в) название работы, г) сокращенное общепринятое название журнала (для книги — место издания), д) том, страница и год.

Фамилии иностранных авторов при цитировании в статье в первый раз даются как на русском, так и на иностранном языке, а при дальнейших ссылках только на русском языке. Одновременно с фамилией цитируемого автора в скобках указывается его порядковый номер по списку литературы. Помещение в списке литературы всех цитируемых в статье работ — обязательно. Приводить в списке литературы работы, не упоминаемые в тексте, не разрешается

Сокращение слов, имен, названий, как правило, не допускается. Разрешаются лишь общепринятые сокращения — различных мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все меры должны даваться в метрической системе, а температура по шкале Цельсия.

Рукописи, оформленные без соблюдения настоящей инструкции, будут возвращаться авторам для исправления.

Если автор в связи с вносимыми исправлениями задержит рукопись свыше одного месяца, статья будет считаться в дальнейшем как поступившая вновь.

Редакция